



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Carrera de Ciencias Biológicas

# “Mecanismos de generalización de intensidad de estímulos olfatorios”

Tesis de licenciatura presentada para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas

Ayelen Nally

Director: Fernando Locatelli  
Co-Director: Emiliano Marachlian



Lugar de Trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Memoria

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular Profesor Héctor Maldonado

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias



Junio 2017



## Resumen

Muchos animales utilizan el sentido del olfato para obtener información relevante del medio ambiente y así dirigir parte importante de su comportamiento. Cada odorante específico activa una combinación particular de receptores periféricos que proveen la entrada sensorial que luego determina su representación interna. En condiciones naturales, los odorantes se encuentran en variadas concentraciones que proveen distintas intensidades del olor. Las mayores concentraciones de odorantes evocan mayor actividad en el lóbulo antenal. Este aumento se observa en términos del número de receptores reclutados y de la intensidad de activación de los mismos. A pesar de estas diferencias los animales son normalmente capaces de reconocer la identidad del olor independientemente de la intensidad.

En este trabajo abordé el estudio de los mecanismos que permiten la generalización de los olores a distintas intensidades, utilizando a las abejas *Apis mellifera* como modelo experimental. En estudios previos se determinó que la red de neuronas inhibitorias locales del lóbulo antenal provee de un mecanismo de control de ganancia que ecualiza la representación de los olores a distintas concentraciones. En esta tesis se pone a prueba mediante ensayos comportamentales y farmacológicos que estas inhibiciones son necesarias para permitir la generalización entre concentraciones.

Mediante imaging de calcio en las neuronas de proyección que representan la salida de información del lóbulo antenal, medí la representación de distintas concentraciones de dos olores a fin de describir la relación entre la intensidad del estímulo y la actividad neuronal evocada. En base a estos resultados seleccioné dos estímulos que difieren en un orden de concentración y los utilicé en ensayos de condicionamiento para evaluar la capacidad de generalización de los animales entre esos dos estímulos. Luego evalué si bloquear las inhibiciones en el lóbulo antenal interfiere con la generalización. Los resultados obtenidos apoyan que la red inhibitoria local en el lóbulo antenal contribuye a la capacidad de los animales de generalizar entre distintas concentraciones del mismo olor.

## Agradecimientos

A Fer, Emi, Martincito y Nico, por haber sido partícipes de una experiencia formativa y enriquecedora tanto a nivel profesional como personal. Gracias por todo lo que me enseñaron, por su buena predisposición, su amabilidad, su compañerismo, sus consejos y su ayuda. En particular a Fer por abrirme las puertas del laboratorio, permitirme realizar esta tesis y junto con Emi acompañarme y guiarme en este proyecto.

A Euge Cozzarin por ayudarme con gran parte de los experimentos comportamentales de nanoinyección.

A lxs integrantes presentes y pasados del “Arco de en frente” por su increíble buena onda y acompañamiento en el día a día durante estos años.

A todxs los integrantes del Laboratorio de Neurobiología de la Memoria que desde el primer momento me hicieron sentir cómoda y contenida. A ellxs gracias por estar siempre que lo necesité, por aconsejarme, por su amabilidad y su buena predisposición para ayudar a los demás. Siempre caracterizadxs por un gran clima de trabajo, colaborativo y sinérgico, y también por un gran compromiso con la educación pública y la sociedad. Me alegra pertenecer a un grupo de estas características, siempre los tengo presente como un gran ejemplo a seguir.

A la Universidad de Buenos Aires y, en particular a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que a esta altura es mi segunda casa, por la posibilidad de recibir una educación pública, gratuita, laica y de calidad.

A Giova Donini, por confiar en mí, por el lugar y las oportunidades que me diste, por todo lo que aprendí(mos), por ser una referente, por estar siempre presente y trabajando como nadie, manteniendo el cariño, el amor y la dedicación intactos a pesar de todo. Por alentarme siempre y consolarme con la palabra justa cuando las cosas se ponían difíciles o perdíamos a algún habitante querido del parque, porque conocerte aportó a que logre una mejor versión de mi misma.

A Cecilia Juárez y Eduardo Fernandez-Duque por las oportunidades que me dieron y por todo lo que me enseñaron.

A lxs queridxs Vicky, Nachín, Arielillo, El Jarabe, El Negro, Virola Jai y Gaby que durante estos años fueron, cada uno a su manera y a su medida, un gran cable a tierra.

A las hermosas personas y grandes amigxs que conocí gracias a esta carrera:

A aquellxs que me acompañan desde los primeros pasos en este camino hasta el día de hoy: El Mono, Uli, Jules, Pauchis, Aro, August, El Chori y Martín, gracias por su compañerismo, su amistad, por las risas, las juntadas, los viajes, los proyectos, los momentos en la biblio, las charlas de pasillo y los interminables debates a lo largo de los años que no son otra cosa más que constructivos.

A Tati, Den, Anita, El Latino, La Nutria y muy especialmente, a Jime, Jess, Martu, Sofi, Moni, El Sanjua, Flor y Pablito. Gracias por su amistad, por su buena onda, por cada juntada, por hacer mucho más llevaderas las cursadas y las infinitas sesiones de estudio, por su visión del mundo, por estar presentes y darme fuerzas o una mano siempre que lo necesité.

Y por último, pero aún más importante, a mi familia por su amor y apoyo incondicional. Especialmente a Michael y Betty que son la razón por la que pude iniciar esta carrera, permanecer en ella y trabajar en el laboratorio realizando esta tesis. A ellxs, infinitas y eternas gracias por su apoyo, por priorizarnos siempre al Pequeño y a mí, por darnos hasta lo que no tenían, por su presencia, sus enseñanzas, por cuidarnos y por dejarnos ser libres. Por bancarme en todas (que no es poca cosa!), por incentivarme, fomentar y alimentar desde siempre el amor por lo que me apasiona y los proyectos que me propongo. Por enseñarme a luchar por lo que creo que es justo y a ser siempre capaz de sentir en lo más hondo, cualquier injusticia realizada contra cualquiera, en cualquier parte del mundo. Por ser un ejemplo de fuerza y superación y, porque a pesar de las diferencias que podamos tener, son de las mejores personas que conozco. Sin su apoyo esto claramente no hubiese sido posible, GRACIAS!!!

# Índice

Resumen.....	1
1. Introducción .....	6
1.1 Olfato y comportamiento.....	6
1.2 El sistema Olfatorio.....	7
1.3 Generalización Olfatoria.....	11
1.4 Control de Ganancia.....	12
1.5 Aprendizaje .....	15
1.6 Objetivos e Hipótesis.....	17
2. Materiales y Métodos.....	19
2.1. Animales... .....	19
2.2. Estímulos .....	21
2.3. Ensayos de Imaging de Calcio.....	24
2.3.1. Representación neuronal de distintas concentraciones de olor en neuronas de proyección.....	24
2.3.2. Análisis de los datos de Imaging de Calcio.....	27
2.4 Ensayos comportamentales.....	27
2.4. 1. Generalización entre intensidades.....	27
2.4. 2. Experimentos farmacológicos: Bloqueo de inhibiciones locales .....	29
3. Resultados.....	32
3.1 Representación dependiente de la concentración .....	32
3.2 Cuantificación de los cambios en la representación .....	35
3.3 Estabilidad y especificidad de la representación de olores .....	40
3.4. Diferencias en los niveles de actividad no implican necesariamente diferencias en la estabilidad de los patrones.....	42

3.5 Generalización comportamental entre concentraciones.....	46
4. Discusión .....	52
4.1 Ensayos de Imaging de Calcio... .....	52
4.2 Ensayos Comportamentales.....	53
5. Referencias bibliográficas.....	55

# 1. Introducción

## 1.1 Olfato y comportamiento

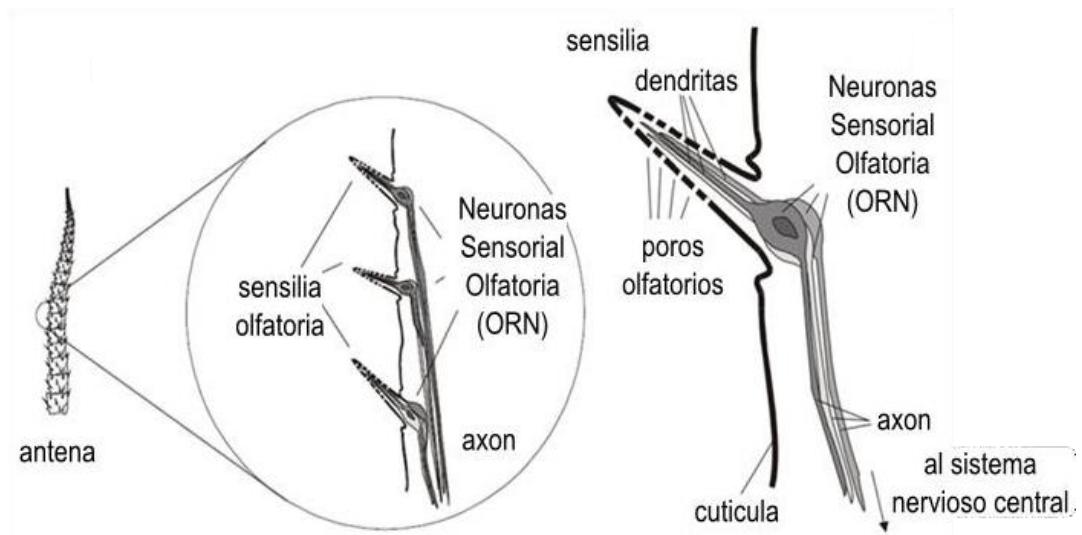
Muchos animales utilizan el sentido del olfato para obtener información del medio ambiente que los rodea y dirigir así parte de su comportamiento. En base a claves olfativas pueden orientarse en la búsqueda de alimento o de pareja y evitar el acercamiento a peligros tales como predadores o sustancias y ambientes tóxicos (Menzel y Greggors, 2013). Resulta entonces relevante para los animales tener un alto grado de sensibilidad por los olores asociados a distintos significados. Los olores, por ejemplo, aquellos vinculados con las fuentes de alimento, pueden variar estacionalmente o incluso a lo largo del día. Los casos más extremos de sensibilidad se dan con las feromonas, que son imprescindibles tanto para la sobrevida del individuo y/o la colonia, como para el aumento del “fitness” (Sandoz et al. 2007). Las feromonas pueden ser de tipo sexual, de cortejo (afrodisíacas), abstinencias (antiafrodisíacas), de marcado de territorio, de señalización de caminos, de alarma y defensa, de agregación y de reconocimiento, de sincronía y coordinación reproductiva, de inhibición de desarrollo gonadal y de determinación de castas (Sandoz et al. 2007; Free, 1987).

En condiciones naturales los olores suelen ser mezclas de múltiples componentes volátiles, es decir, los olores mono-moleculares prácticamente no existen, sino que están compuestos por distintos tipos de moléculas que varían en su cantidad, calidad y concentración (Gottfried 2010). En cuanto a este último punto, normalmente se presentan ante el animal en un amplio rango de intensidades, lo cual puede depender de la fuente del olor, del tipo de odorante, de la distancia entre un animal y la fuente, de la dirección del viento, la turbulencia del flujo, la temperatura y la humedad del aire. Los animales deben ser capaces de reconocer que se trata del mismo olor, independientemente de las distintas intensidades en las que este se presente. Por ejemplo, para poder navegar una pluma de olor en intensidad creciente hasta encontrar su fuente el animal no solo requiere evaluar el cambio en la intensidad sino también debe ser capaz de reconocer si el olor es el mismo.

**La habilidad de generalizar la identidad de un olor a distintas intensidades no resulta trivial a nivel de los receptores ni de los circuitos neuronales de procesamiento de la información olfatoria y es el objeto de estudio en este proyecto.**

## **1.2 El sistema olfatorio**

El funcionamiento general del sistema olfatorio desde la transducción de ciertas propiedades de los odorantes en los receptores ubicados en la periferia hasta su codificación en el sistema nervioso central, se encuentra conservado en todos los organismos que posean un sistema de olfato (Hildebrand y Shepherd, 1997), incluso en aquellos con una sustancial divergencia a nivel evolutivo como es el caso de himenópteros y roedores. Por lo tanto, el estudio de unos aporta también en la comprensión de otros. Particularmente, en el caso de las sensillas antenales vinculadas a la olfacción existen diversos subtipos, sin embargo, todos ellos se caracterizan por estar conformadas por una estructura cuticular altamente porosa con terminales dendríticas en su interior, provenientes de Neuronas Receptoras Olfatorias (ORN, por sus siglas en inglés) (figura 1.1).

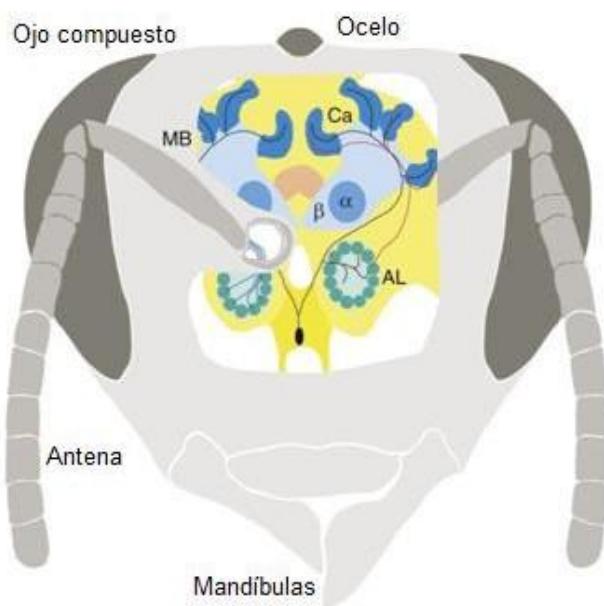


**Figura 1.1 A.** Esquema de la antena. En su cutícula se encuentran las sensilias olfatorias que contienen a las neuronas sensoriales olfativas. Las moléculas odorantes atraviesan la cutícula a través de sus poros e interactúan con las dendritas de neuronas receptoras olfatorias a través de proteínas receptoras. La apertura de canales en la membrana de las neuronas inicia señales eléctricas que viajan hacia niveles de procesamiento mayor por sus axones. Puede observarse que en cada sensilia hay más de una neurona sensorial (ORN).

Las moléculas volátiles impactan en la periferia de las sensilias olfativas, atraviesan los poros olfatorios de la cutícula y luego toman contacto con la membrana dendrítica de las neuronas receptoras olfatorias a través de la unión reversible con las proteínas receptoras olfatorias. La interacción de las moléculas odorantes con las proteínas receptoras se da a partir de las características fisicoquímicas de estas moléculas, tales como su polaridad, largo de cadena, peso molecular, grupos químicos, entre otras. Esto conduce a la apertura de canales de sodio y calcio que disparan señales eléctricas en las células receptoras (Silbering y Benton, 2010). Si bien no se sabe con exactitud qué propiedades fisicoquímicas de cada molécula son sensadas, si se sabe que existen distintos tipos de receptores: especialistas o generalistas, los primeros se activan por una única molécula (por ej. Semioquímicos: sustancias naturales producidas y utilizadas por animales y plantas en la comunicación, tales como las feromonas) y los segundos corresponden a la gran mayoría de los receptores olfatorios y presentan diversos subtipos que se especializan en distintos tipos de odorantes, es decir, éstos receptores no son específicos de un único

odorante, sino que cada receptor responde a más de un odorante y, además, cada odorante activa más de un receptor (Hallem y Carlson, 2006).

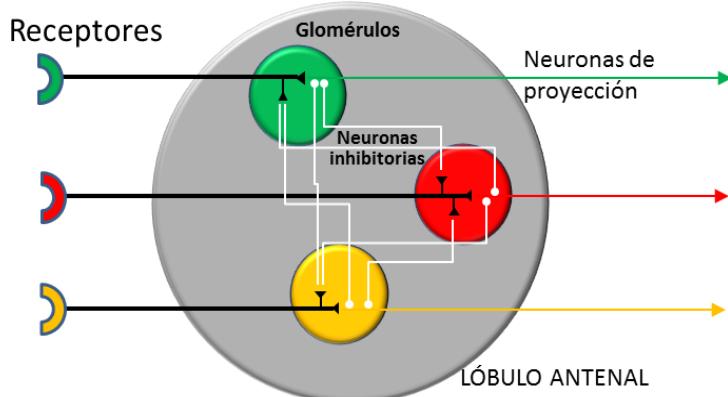
La información sensada por las neuronas sensoriales olfatorias viaja a través del nervio antenal convergiendo en los Glomérulos del Lóbulo Antenal (AL, por sus siglas en inglés), el primer centro de procesamiento olfatorio (figura 1.2).



**Figura 1.2** Representación del cerebro de una abeja *Apis mellifera*. Se esquematiza la antena y la cabeza con los axones provenientes de las neuronas sensoriales olfatorias (izquierda), que convergen en el nervio antenal dirigiéndose hacia los glomérulos del lóbulo antenal (AL), que a su vez hacen sinapsis con neuronas de proyección (PN) que llevan la información a los Mushroom Bodies (MB), cuyos cálices (Ca) se representan en azul y sus lóbulos  $\alpha$  y  $\beta$ , en dos tonalidades de celeste.

La información proveniente de cientos a miles de Neuronas Sensoriales Olfatorias del mismo tipo converge en el mismo Glomérulo en donde hacen sinapsis con muy pocas Neuronas de Proyección (PN, por sus siglas en inglés), generando un incremento en la sensibilidad y una mejora en la relación señal/ruido. En el lóbulo antenal no sólo hacen

sinápsis las neuronas sensoriales olfatorias con las neuronas de proyección, sino que también existen Neuronas Locales Inhibitorias (LIN, por sus siglas en inglés) (figura 1.3) (Wilson y Mainen, 2006). Estas interneuronas locales interconectan los glomérulos y modifican la representación del olor que es enviada a otras áreas del cerebro a través de las Neuronas de Proyección (PNs). La información sale por vías directas e indirectas del Lóbulo Antenal, hacia centros de procesamiento de segundo orden: el Protocerebro Lateral y los “Mushroom bodies” (MB) (ver figura 1.2) (Mobbs, 1982).



**Figura 1.3** Esquema del Lóbulo Antenal. Entrada de la información a los Glomérulos proveniente de los receptores de Neuronas Sensoriales Olfatorias, la salida de la información converge en las Neuronas de Proyección y los circuitos inhibitorios gabaérgicos.

Los MB son un centro integrador, no sólo de información olfativa sino también de información visual y mecano-sensorial. Las neuronas intrínsecas de los mushroom bodies, las celulas de Kenyon (KC), reciben información del olor que llega codificada como combinación de sus neuronas presinápticas. Las PNs que portan la información de la activación de cada subtipo de ORN hacen sinapsis con diferentes KCs de modo que, por ejemplo, una determinada KC se enciende ante una combinación específica de PNs (Locatelli y Rela, 2015). De este modo la identidad con que se percibe a un odorante, es decir, la percepción y el reconocimiento del olor está dado por la combinación específica de los receptores que han sido activados en las Neuronas Sensoriales Olfatorias y por los efectos del procesamiento realizado por las neuronas locales hasta llegar a los MB.

### 1.3 Generalización olfatoria

Al aumentar la concentración del olor, aumenta también la probabilidad de activar receptores con menor afinidad por el odorante, lo cual conlleva a cambios en la combinación de ORNs que son reclutadas (figura 1.4). En consecuencia, el mismo olor presenta cambios significativos en el patrón de activación de ORNs y por tanto no resultan triviales los mecanismos que permiten la generalización a través de distintas concentraciones. De este modo, el problema central en la generalización de intensidades radica en cómo el sistema nervioso es capaz de reconocer el mismo olor en distintas concentraciones a pesar de que distintas concentraciones pueden evocar distintos patrones de input (Stopfer et al., 2003).

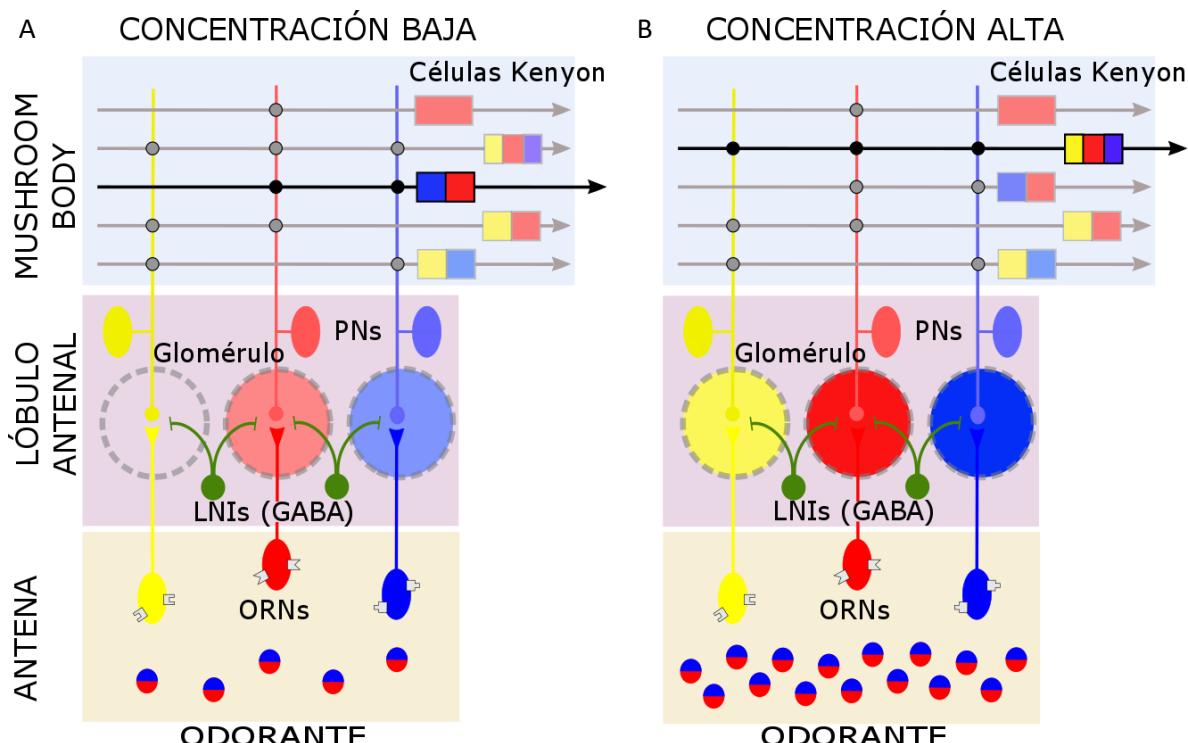


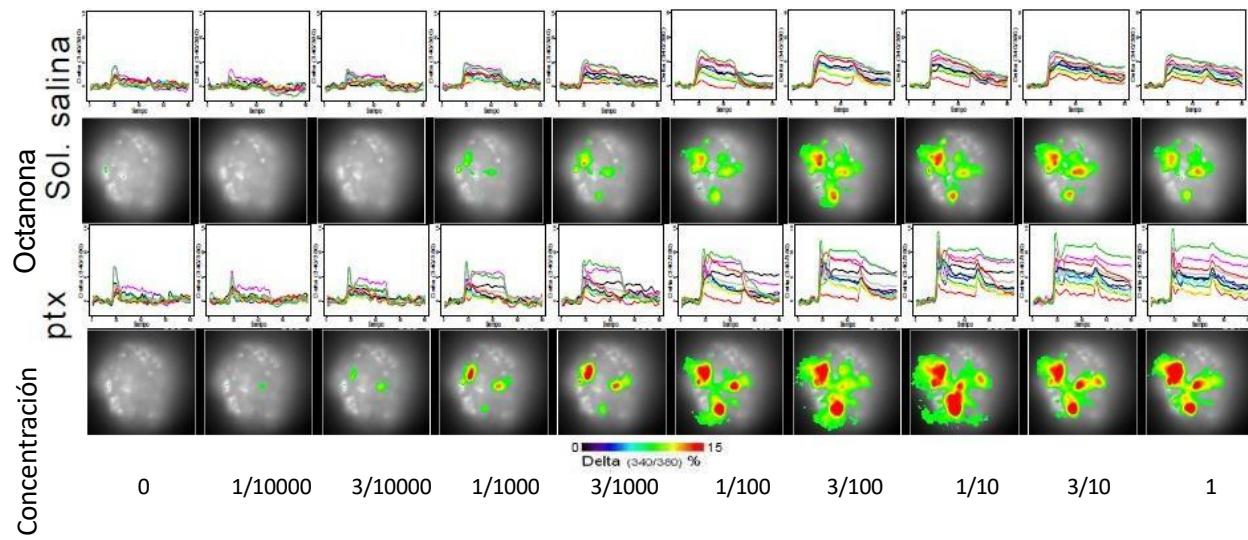
Figura 1.4 Representación del problema central de la generalización de olores a nivel de la codificación en el sistema olfatorio de una abeja *Apis mellifera*. Moléculas de un odorante puro son identificadas por receptores en Neuronas Sensoriales Olfatorias de la antena. Las ORNs del mismo tipo llevan la información a un Glomérulo en el Lóbulo Antenal. Las Neuronas de Proyección llevan esta información a las Kenyon Cells de los Mushroom Bodies, donde se genera una representación interna del patrón. A. Se observa el patrón generado por un odorante puro en baja concentración. B. Se observa el patrón generado por un odorante puro en alta concentración. Al comparar A con B puede verse que en ausencia de inhibiciones locales

(Neuronas Locales Inhibitorias, gabaérgicas) en el lóbulo antenal, los patrones de activación en las KC para una concentración baja de un olor podrían ser distintos a los de una concentración alta del mismo estímulo. Esto puede tener consecuencias en el comportamiento del animal puesto que implica cambios en la representación interna de este estímulo.

Si el patrón de KC activadas por un olor cambia dependiendo de la concentración del estímulo, esto implicaría cambios en la identidad que se asigna al olor lo cual no sería adaptativo. Por esta razón, es un postulado del presente trabajo que deben existir mecanismos que permitan disminuir este efecto contribuyendo a la generalización de la identidad del olor a través de cambios en la concentración. Se propone un mecanismo a nivel del circuito del lóbulo antenal dado por inhibiciones locales gabaérgicas a través de Neuronas Locales Inhibitorias. Al existir inhibiciones cruzadas entre glomérulos asociados a receptores con mayor y menor afinidad por el odorante, los primeros tendrían mayor actividad glomerular y ejercerían mayor inhibición sobre los segundos. Esto permitiría la estabilidad del patrón del olor a pesar de cambios en la intensidad. De este modo, los glomérulos que se reclutan cuando la concentración del olor aumenta, recibirían inhibiciones que retrasan (en términos de la concentración) su incorporación en el patrón de actividad evocada.

#### **1.4 Control de ganancia**

En experimentos previos realizados en el laboratorio, se estudió la representación neuronal de olores a distintas concentraciones utilizando a la abeja *Apis mellifera*. Mediante la técnica de Imaging de Calcio se midieron patrones de activación en el lóbulo antenal. Se mostró que los patrones de activación evocados por concentraciones crecientes de olor en las neuronas de proyección se encuentran parcialmente estabilizados gracias a la acción de inhibiciones GABAérgicas locales (Tesis Doctoral, Emiliano Marachlian) (figura 1.5).

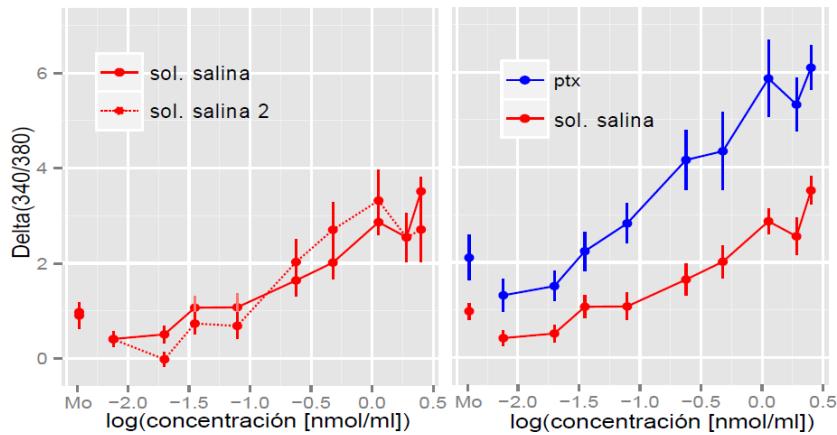


**Figura 1.5** Rol de las inhibiciones en la relación respuesta/intensidad del estímulo. Efecto del bloqueante del receptor de GABA-A, picrotoxina. Ejemplo de un animal ante el olor puro 2-Octanona a concentraciones crecientes de izquierda a derecha, con una primera serie de mediciones con solución salina y una segunda serie de mediciones con picrotoxina 10 $\mu$ M. Las imágenes muestran patrones de activación como respuesta de calcio superpuestos a la imagen de fluorescencia del lóbulo antenal. Las curvas asociadas representan el perfil temporal de activación de cada glomérulo identificado.

Se demostró que el agregado de bloqueantes de receptores de GABA (Tesis Doctoral, Emiliano Marachlian), aumenta la intensidad de las señales de calcio (figura 1.6). Esto implica que GABA tiene un rol en la modulación de los niveles generales de actividad y actúa en la dirección de homogenizar la actividad evocada a lo largo de la concentración (Sachse y Galizia 2003). Además, en trabajos aún sin publicar se mostró que GABA no sólo estabiliza el nivel de actividad sino que también estabiliza los patrones, de modo que cuando GABA actúa los patrones evocados por un olor a distintas concentraciones son más parecidos entre sí que cuando los canales GABA son bloqueados por medio de un coctel de picrotoxina (PTX) y CGP (bloqueantes de canales GABA-A y GABA-B respectivamente).

Por lo tanto, en el modelo de generalización olfatoria explicado en la sección anterior se propone que una red de inhibición GABAérgica local en el lóbulo antenal estabilizaría la codificación de olores y la información que se transfiere a las KCs en un amplio rango de

concentraciones de estímulos olfatorios y favorecería la generalización comportamental del mismo olor a distintas concentraciones.



**Figura 1.6** Control de ganancia y efecto del inhibidor de GABA-A, picrotoxina (ptx). Curvas de actividad promedio en función de la concentración de 2-octanona. A la izquierda se muestran resultados de animales en los que se realizaron dos series de mediciones con solución salina fisiológica. A la derecha se muestran resultados de animales en los que se realizó una serie de mediciones con solución salina y luego otra serie con PTX. En presencia de PTX se observa aumento en la actividad basal y también aumento en la pendiente denotando una disminución en el control de ganancia. El valor Mo sobre el eje X corresponde a la actividad evocada por el aceite mineral (solvente) que sirve de control de actividad basal.

En este punto, si bien GABA tendría un rol en la estabilización de la representación interna de los olores a lo largo de distintas concentraciones, no hay evidencia de que esta estabilidad en la codificación tenga efecto o favorezca la generalización comportamental.

En este proyecto se abordó el estudio de los mecanismos de control de ganancia en el sistema olfatorio poniendo a prueba mediante ensayos comportamentales y farmacológicos la hipótesis de que el funcionamiento del sistema inhibitorio local en el lóbulo antenal es necesario para que los animales generalicen un mismo olor presentado a distintas intensidades.

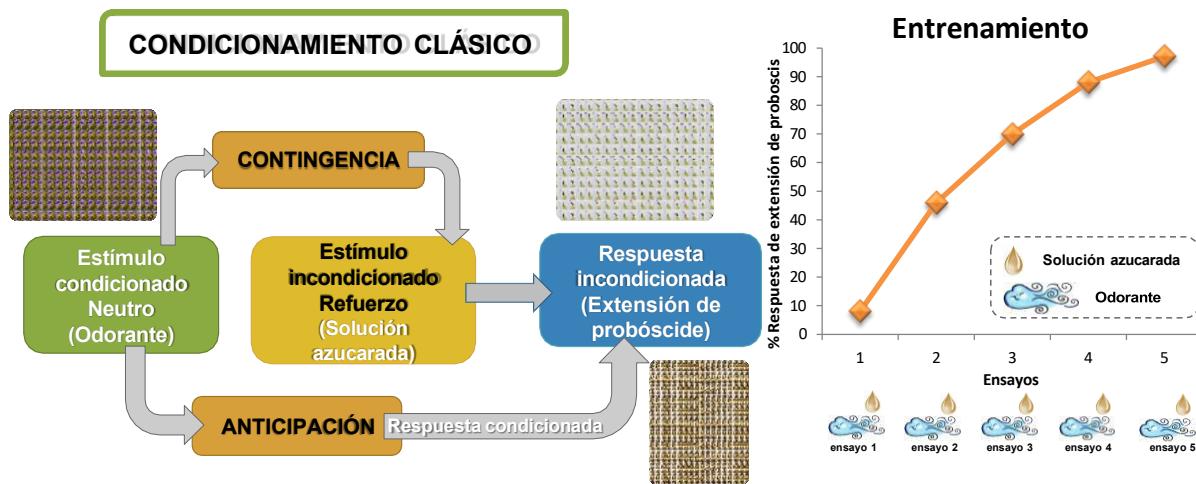
## **1.5 Aprendizaje y generalización**

Un ensayo para medir generalización o discriminación entre dos estímulos implica poder medir o evidenciar que es lo que el animal percibe o cual es el significado que el animal asigna a los dos estímulos en cuestión. Sin embargo, la mayor parte de los estímulos que un animal percibe no generan una respuesta innata que pueda ser medible y cuantificable. Por ello, para poder medir la percepción de un estímulo que no desencadena respuesta es necesario primero entrenar a los animales a responder a dicho estímulo. Esto requiere de un entrenamiento que al finalizar permita evaluar si el animal percibe y discrimina los estímulos en cuestión.

Para ello se utiliza un condicionamiento clásico el cual implica una asociación entre dos estímulos, uno neutro que no genera respuesta innata y uno incondicionado que tiene valor innato y genera una respuesta evidente y medible. Durante el entrenamiento, ambos estímulos se presentan de manera contingente y contigua de modo tal que se establece una asociación entre los mismos. Al terminar el entrenamiento, el estímulo condicionado permite al animal predecir la ocurrencia del refuerzo y por ello evoca una respuesta condicionada anticipándose al estímulo incondicionado. Cabe destacar que para generar este tipo de aprendizaje es necesario que exista una relevancia biológica entre el estímulo condicionado y el incondicionado, dado que no es posible asociar dos estímulos cualesquiera (Garcia y Koelling, 1966).

En la naturaleza las abejas utilizan la probóscide, una estructura del aparato bucal compuesta por las maxilas y el labio, para liberar néctar o miel. La extensión de la probóscide puede ser observada a ojo desnudo y es utilizado como indicador de la motivación del individuo para ingerir un alimento dado. Mediante la estimulación con néctar o agua azucarada en las antenas se produce una respuesta refleja de extensión de la probóscide. Por ello, el azúcar puede ser tomada como estímulo incondicionado en un paradigma de aprendizaje, y la extensión de la probóscide puede ser tomada como respuesta comportamental que puede ser medida y cuantificada.

Teniendo en cuenta estas características típicas de la especie, en el laboratorio se aprovecha el condicionamiento clásico de extensión de la probóscide (PER) para poner en evidencia la percepción de un olor inicialmente neutro y para evaluar el grado de generalización o discriminación entre dos estímulos olfatorios (Bittermann et al., 1983) (figura 1.7).



**Figura 1.7 A.** Diagrama representativo de un condicionamiento clásico apetitivo para el caso de abejas *Apis mellifera*. Se muestra como un estímulo condicionado inicialmente neutro (ej. Odorante) puede ser presentado en forma contingente con un estímulo incondicionado (ej. solución azucarada), generando una respuesta incondicionada (ej. Extensión de la probóscide). Ante la repetición de este evento se genera una anticipación tal que ante la sola presencia del estímulo condicionado se desencadena la respuesta condicionada. **B.** Representación del resultado de un entrenamiento de condicionamiento clásico apetitivo en *Apis mellifera*. A medida que transcurren los ensayos la respuesta condicionada aumenta hasta llegar a una asymptota.

## **1.6 Objetivos e hipótesis**

### **Hipótesis**

- Las abejas son capaces de generalizar entre distintas intensidades del mismo olor, de manera tal que una respuesta condicionada a una concentración del olor puede ser evocada a otras intensidades más bajas y más altas del mismo olor.
- El mecanismo de control de ganancia mediado por inhibiciones de tipo GABA-A y GABA-B en etapas tempranas del procesamiento de información olfatoria en el lóbulo antenal contribuye a la generalización comportamental entre olores a distinta intensidad.
- El control de ganancia que estabiliza la combinación de neuronas que representan la identidad del olor independientemente de la intensidad del mismo emerge a partir del procesamiento de la información en la red del lóbulo antenal.

### **Objetivos generales**

Estudiar el rol de los mecanismos responsables de modulación de la ganancia que permiten la generalización de olores a distintas intensidades utilizando como modelo a la abeja *Apis mellifera*.

### **Objetivos particulares**

- Medir patrones de actividad en neuronas de proyección evocados por olores a distintas concentraciones.
- Evaluar el grado de generalización comportamental entre distintas intensidades de un mismo olor. Para ello se entrenará a las abejas a una intensidad baja de olor y se medirá la generalización de la respuesta aprendida a una concentración mayor, y viceversa.

- Evaluar el papel de las inhibiciones locales en el lóbulo antenal en la generalización entre distintas intensidades de un mismo olor. Comprobar si interferir con la inhibición GABAérgica en los lóbulos antenales afecta la generalización de olores a distintas intensidades.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Animales

Se trabajó con abejas *Apis mellifera* obtenidas de colmenas ubicadas en el predio de Ciudad Universitaria ( $34^{\circ}32' S$ ;  $58^{\circ} 6' W$ ). Las abejas son libres de forrajar en Ciudad Universitaria y sus alrededores. Tanto para los experimentos comportamentales como para los experimentos de imaging de calcio se utilizaron abejas recolectoras de polen ya que son fácilmente distinguibles al momento de ser capturadas (Fig. 2.1). Los animales fueron capturados obstruyendo la entrada de la colmena e identificando las abejas recolectoras que regresaban con polen en sus patas traseras. Los animales que se encuentran en edad de forrajeo tienen entre 15 y 40 días de edad y diariamente se movilizan a fuentes de alimento, trasladándolo a la colmena en ciclos de forrajeo.

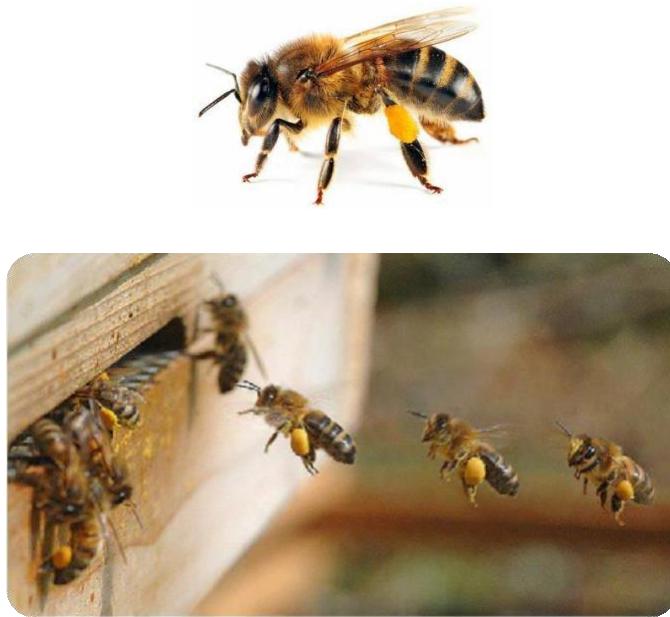


Figura 2.1 Abeja *Apis mellifera* recolectora de polen e imagen de entrada de una colmena. Se pueden ver de forma claramente distinguible a ojo desnudo abejas forrajeras con polen en sus patas traseras.

Las abejas fueron capturadas en grupos de 5 a 7 individuos pertenecientes a la misma colmena (para evitar interacciones agonísticas) dentro de tubos de vidrio con orificios en sus tapas para asegurar la entrada de aire. Se procuró que el tiempo que las abejas permanecían en los tubos no supere los 20 minutos con el fin de reducir la posibilidad de daños por estrés o hipoxia. En los

tubos las abejas fueron trasladadas al laboratorio donde fueron anestesiadas en hielo por aproximadamente 5 a 10 minutos hasta evidenciar inactividad. Una vez que los animales se encontraban inmóviles se los manipuló individualmente y se los colocó en cepos individuales aptos para mediciones comportamentales o para registros de actividad neuronal mediante imaging de calcio (figura 2.2). Una vez en los cepos, las abejas fueron alimentadas con solución de sacarosa 1,0 M. Los animales de imaging *ad libitum*, mientras que los animales utilizados para experimentos comportamentales recibieron 5 gotas de 0,5 $\mu$ l 1M. En el laboratorio, las abejas fueron mantenidas en una caja generando un ambiente húmedo y a temperatura ambiente (20-24°C) en un ciclo luz:oscuridad 12:12hs. Las sesiones de entrenamiento y testeo se llevaron a cabo entre 10:00 AM y 17:00 PM comenzando todos los experimentos 1 día después de la captura de los animales.

Los cepos para experimentos de comportamiento (figura 2.2 C-E) consisten en un tubo de aluminio de media cuña en el que cada abeja es ubicada en forma vertical y luego es sujetada a la altura de la cabeza y a la altura del tórax y abdomen por medio cinta adhesiva. La cabeza de cada animal se fija a la cinta adhesiva con de una gota de cera por medio de un soldador de temperatura moderada. Los cepos permiten mantener a los animales inmovilizados disminuyendo la posibilidad de picaduras y posibilitando el libre movimiento de las piezas bucales y las antenas.

Para los experimentos de imaging de calcio se requiere de una mayor estabilidad en la fijación del animal y además de un espacio adecuado alrededor de la cabeza del animal para poder mantener el cerebro sumergido en solución salina durante los registros ópticos. Para ellos se utilizó otro tipo de cepos individuales de aluminio (figura 2.2 A-B, D) en los cuales la cabeza del animal queda inmovilizada al ser sujetada por medio de cera al cepo, que fue sellado en los márgenes del mismo y del cuerpo del animal por medio de un soldador y cera común. Luego, las antenas fueron posicionadas hacia adelante e inmovilizadas de modo tal de protegerlas de un posible contacto con el soldador. Seguidamente se sella con cera todo el entorno entre la cabeza y el cepo de manera de generar un espacio estanco en donde posteriormente se ubicarán soluciones cuando el

animal tiene el cerebro expuesto para ser observado bajo el microscopio. En el momento de la medición de imaging de calcio el tórax y abdomen son sujetados con una esponja para limitar al máximo el movimiento del animal.

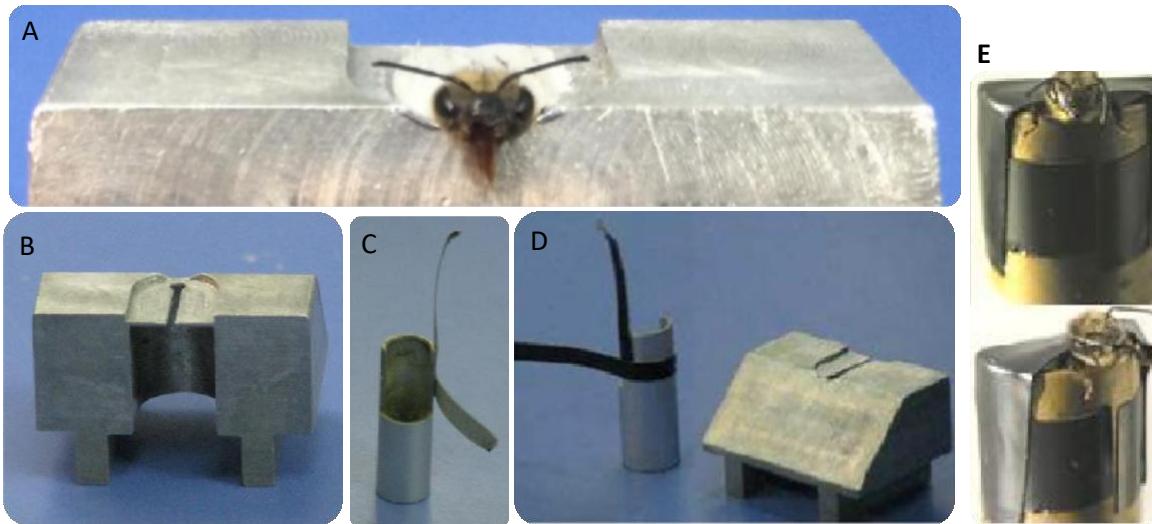


Figura 2.2 Imagen de los cepos utilizados durante los experimentos de comportamiento y de imaging de calcio A. Vista frontal de un cepo con una abeja colocada para realizar experimentos de imaging de calcio. B. Vista posterior de un cepo para experimentos de imaging de calcio. Puede observarse una ranura que permite colocar a la abeja de forma tal que la cabeza se mantenga expuesta en la parte superior y, el tórax y el abdomen se ubiquen en la cavidad inferior. Durante los experimentos de imaging de calcio se presionan el tórax y abdomen con una porción de esponja para evitar movimientos y en la parte superior se construye con cera una cavidad estanca alrededor de la cabeza que servirá para mantener al cerebro expuesto sumergido en solución salina. C. Vista frontal de los cepos comportamentales y de imaging de calcio. D. Vista posterior del tipo de cepo utilizado en los experimentos comportamentales. El cepo consta de un tubo de media cuña cortado de modo tal que la abeja puede ser colocada de manera vertical. Las cintas adhesivas permiten tratar el abdomen y el tórax de la abeja. E. Vista frontal y lateral de una abeja ubicada en el cepo utilizado para experimentos comportamentales.

## **2.2. Estímulos**

Los estímulos olfatorios utilizados fueron el olor 2-octanona y una mezcla de 1-Hexanol y Acetofenona en partes iguales (todos los odorantes obtenidos de Sigma Aldrich,

Argentina). Tanto en el caso del olor puro como en el de la mezcla los odorantes fueron diluidos en aceite mineral.

Las concentraciones utilizadas en los experimentos se indican en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Detalle de las concentraciones utilizadas en los experimentos para el olor 2-octanona y para la mezcla binaria de 1-hexanol+acetofenona. Las relaciones indican la dilución volumen/volumen del olor en aceite mineral. Los estímulos utilizados para imaging de calcio y para ensayos comportamentales se utiliza el volumen de la parte superior de un frasco en el que los olores volatizan, según se indicada en la tabla. En el dispositivo utilizado para estimular con olor, todas las muestras son diluidas 10 veces.

OLOR	DILUCIÓN DEL OLOR EN ACEITE MINERAL			
2 octanona	3/10	3/100	3/1000	3/10000
Mezcla	3/10	3/100	3/1000	3/10000

En todos los experimentos se utilizó un dispositivo automatizado para controlar la administración de los odorantes. Este dispositivo denominado “olfatómetro” permite controlar la concentración del estímulo, su duración y sincronización con la toma de datos.

El olfatómetro consiste básicamente en una serie frascos cerrados que contienen un volumen líquido de olor en la dilución indicada y un espacio en el cual se acumula el vapor de olor en estado gaseoso hasta alcanzar su equilibrio de presión de vapor. Válvulas eléctricas independientes controlan la apertura y cierre del flujo de aire a través de cada frasco. Cuando la válvula se abre se desplaza un volumen de la porción gaseosa del frasco. Esta porción se mezcla con el caudal central de aire limpio que se utiliza como portador del olor hasta el animal. La muestra que sale del frasco se diluye 10 veces en el volumen de aire portador. El flujo final de aire con olor que impacta las antenas de las abejas es de 500 ml/minuto. Diez centímetros por detrás de las abejas, el aire de la arena experimental y los olores son removidos continuamente por un sistema de extracción (Figura 2.3 (A)).

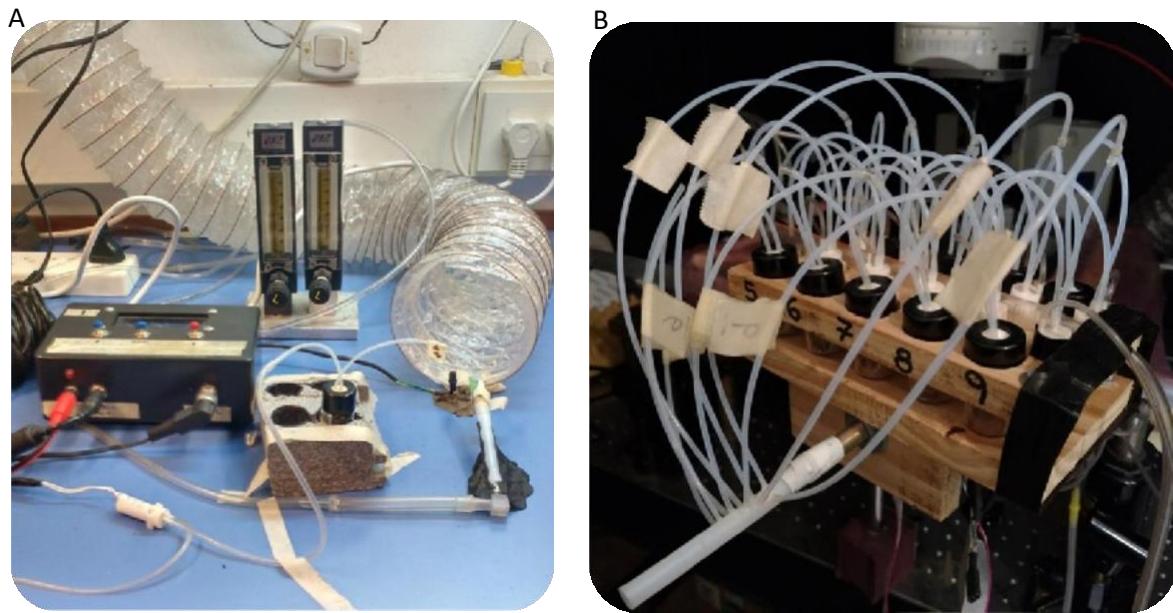


Figura 2.3 Dispositivos experimentales utilizados. A. Dispositivo experimental para los experimentos comportamentales. Cada frasco contiene una dilución de olor en aceite mineral a una concentración dada de un odorante (ver tabla 2.1). B. Dispositivo experimental utilizado para el control y distribución de los olores en los experimentos de imaging de calcio. Cada frasco contiene una dilución de olor en aceite mineral (ver tabla 2.1). En ambos casos el contenido del espacio aéreo del frasco se inyecta en el tubo de caudal central que porta el olor hasta la abeja. La dilución del aire con olor en el aire central es de 1/10.

En el caso de los experimentos de comportamiento el olfatómetro constó de solo dos frascos que contenían las dos diluciones a usar durante la sesión de entrenamiento y la sesión de evaluación. En el caso de los experimentos de Imaging, el olfatómetro constó de 10 frascos. Cada uno contenía la dilución de un olor como se indica en la tabla 2.1. Mediante la apertura de válvulas comandadas desde el equipo se sincroniza la toma de datos de Imaging con el comienzo y final del estímulo (Figura 2.3 (B)).

## **2.3. Ensayos de Imaging de Calcio**

### **2.3.1 Representación neuronal de distintas concentraciones de olor en neuronas de proyección**

Con el objeto de estudiar la relación entre la intensidad del estímulo y los patrones de actividad neuronal evocados se realizaron experimentos de imaging de calcio en el lóbulo antenal.

Para ello se utilizó el colorante sensor de calcio Fura-dextrano (sal de potasio, 10.000MW; Invitrogen, Eugene, EE.UU.), éste es un marcador de calcio intracelular que gracias al dextrano viaja activamente distribuyéndose dentro de la célula. Fura tiene dos picos de absorción correspondientes a las longitudes de onda de 340nm y 380nm según si el colorante este asociado a calcio o no. A medida que aumenta la concentración de calcio, aumenta la porción de moléculas de fura que emiten si son estimuladas a 340nm y disminuye la porción de moléculas de fura que emiten si son estimuladas a 380nm. De este modo iluminando selectivamente a 340nm y a 380nm, mientras en el caso de iluminación a 380nm a medida que la concentración de calcio aumenta la fluorescencia disminuye, en el caso estimulado con 340nm a medida que la concentración de calcio aumenta la fluorescencia también lo hace. Por lo tanto, al calcular la relación entre la fluorescencia emitida para cada longitud de onda como  $\Delta = F_{340}/F_{380}$  se obtiene un parámetro que da la variación de luminosidad independientemente de si hay variaciones en la eficiencia o cantidad de colorante y aumentando considerablemente la sensibilidad de la medición dado que de esta relación se obtienen valores en un rango más grande que el de cada longitud de onda por separado (Tesis Doctoral, Emiliano Marachlian).

Entonces, utilizando este colorante se tiñeron las neuronas de proyección por llenado reverso desde los calices de los "Mushroombodies". Para aplicar el colorante se fijaron las antenas por medio de Eicosano (Sigma-Aldrich) y se realizó una ventana en la cutícula en la zona dorsal de la cabeza, específicamente por debajo de las antenas y en forma rectangular hasta la altura del ocelo medial de modo tal de exponer el cerebro (Figura

2.5). Se prosiguió removiendo las tráqueas y glándulas de la zona hasta identificar la zona de inyección del colorante. Mediante un microelectrodo de vidrio se insertó un cristal de Fura-dextrano en el área del cerebro donde el tracto anteno-protocerebral lateral (l-APT) inerva los calyces laterales de los “Mushroombodies”. Una vez disuelto el cristal de colorante en ese sitio, se retira el electrodo y se vuelve a cubrir el cerebro con la misma porción de cutícula que había sido anteriormente removida. Luego se dejó a las abejas al menos 10 horas durante las cuales el colorante migra por los axones de las neuronas de proyección hasta teñir los glomérulos en los lóbulos antenales.

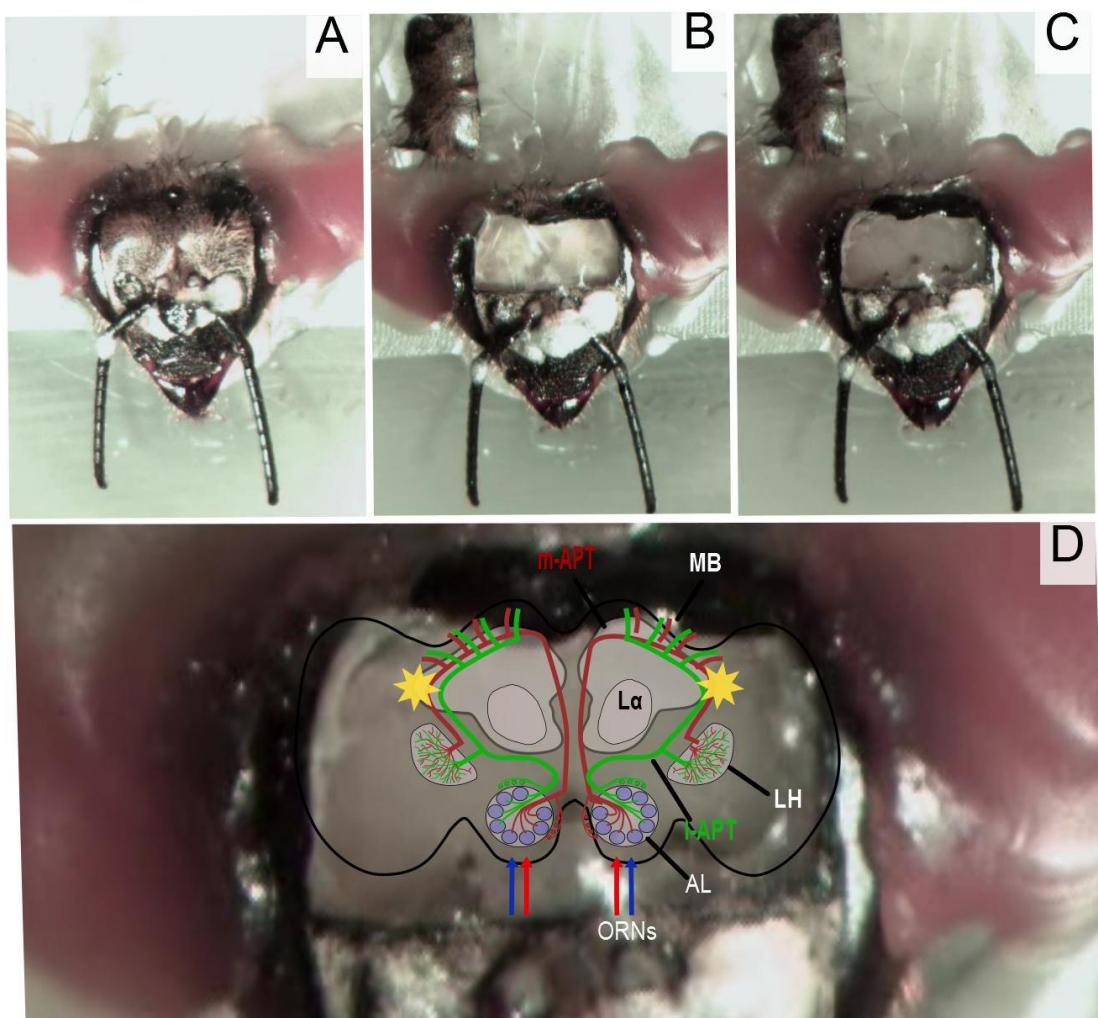


Figura 2.5 Tinción de las neuronas de proyección. Vista superior de la cabeza de una abeja en un cepo de imaging de calcio. (A). Animal fijo en el cepo. Sobre las antenas se ve el Eicosano (Sigma-Aldrich) utilizado para fijar la posición de las antenas. (B). Apertura de un rectángulo en la cutícula exponiendo el cerebro. En

el margen superior izquierdo de la imagen puede verse el rectángulo de cutícula removido que se utiliza luego de la tinción para recubrir la zona. (C). Imagen posterior a la remoción de glándulas y tráqueas de la zona, exponiendo el Lóbulo  $\alpha$ . (D). Imagen aumentada de (C) sobre la cual se esquematizan las regiones que se utilizan como guía para la inyección del colorante. LA: Lóbulo Antenal, MB: Mushroombody, L $\alpha$ : Lóbulo  $\alpha$  y LH: Lateral horn. También se esquematizan los axones de las ORNs que convergen en el lóbulo antenal. Los asteriscos amarillos indican el lugar en donde se aplica el electrodo cargado con el colorante.

El día de las mediciones se lava el exceso de colorante con solución salina y se comprueba que los lóbulos antenales se encuentren correctamente teñidos. Para registrar la actividad neuronal se utiliza un equipo ‘TillPhotonics’ de adquisición de imágenes asociado a un microscopio de fluorescencia ‘Olympus BX51’. Para evitar movimientos de la preparación que afecten las mediciones se aplicó sobre el cerebro una capa de Kwiksil (WPI). Este producto consiste en dos componentes transparentes de consistencia líquida viscosa que al mezclarse producen un producto transparente que se endurece y gelatiniza en pocos minutos. Esta aplicación mantiene humectado el cerebro, reduce movimientos y dado que es transparente no perjudica la adquisición de los registros ópticos para imaging de calcio.

Se tomaron los datos de los patrones espaciales de la actividad glomerular evocada por olores a concentraciones crecientes. Los olores utilizados, al igual que en los análisis comportamentales, fueron el olor puro, 2-octanona, y la mezcla de los odorantes 1-hexanol y acetofenona. Luego, los datos fueron procesados de modo tal que se realizaron correcciones por movimientos de cada abeja durante el experimento mediante rutinas programadas en IDL. Se identificaron regiones de interés que corresponden a glomérulos que fueron revelados por actividad evocada con al menos alguna de las concentraciones de los dos estímulos, 2-octanona o mezcla. Por último, para cada individuo se realizaron cuantificaciones del nivel de actividad para cada una de las regiones de interés identificadas previamente. Este tipo de mediciones nos permite poner en evidencia que la intensidad y distribución espacial de los glomérulos reclutados depende de la identidad del olor y de su intensidad.

### **2.3.2 Análisis de los datos de Imaging de calcio**

Para analizar la actividad neuronal registrada por imaging de calcio se tuvieron en cuenta 15 regiones de interés identificadas en cada individuo y se realizaron análisis temporales estudiando los patrones espaciales de actividad evocada por los olores. Cada medición de imaging de calcio constó de un registro de 50 cuadros obtenidos a una tasa de adquisición de 5hz. La duración total de cada registro fue de 10 segundos y la estimulación con olor estuvo presente 4 segundos desde el cuadro 15 al 35. Para evaluar el promedio de actividad evocada se integró una ventana temporal durante el primer segundo desde iniciada la estimulación, entre los cuadros 16 y 20 del registro, que corresponden al tiempo de comienzo del estímulo y contienen el máximo valor de actividad de cada glomérulo en respuesta al estímulo. Se comparan, por un lado, las respuestas glomerulares y se analizan los patrones obtenidos; también se compara la actividad promedio. Las comparaciones estadísticas se hicieron mediante un T de Student mediante el programa Statistics® para evaluar las diferencias entre las concentraciones que luego serían utilizadas en ensayos comportamentales.

## **2.4 Ensayos Comportamentales**

### **2.4.1 Generalización entre intensidades**

Para poner a prueba si los animales generalizan o discriminan entre dos concentraciones del mismo olor, se utilizó un protocolo de condicionamiento olfatorio apetitivo (Bitterman, 1983). Se entrenó a las abejas con una concentración de olor y, luego se evaluó si la respuesta condicionada era evocada por el mismo olor, pero a una concentración distinta.

Se utilizó como estímulo condicionado (CS) un olor y como estímulo incondicionado (US) agua azucarada (Sacarosa 2M). La presentación pareada del CS y el US, desencadena una respuesta incondicionada (UR) de extensión de la probóscide. A lo largo del condicionamiento se genera una asociación entre el CS y el US, lo cual desencadena una

respuesta condicionada (CR) ante la sola presentación del CS y antes de la llegada de la recompensa (figura 2.6).



Figura 2.6 Condicionamiento clásico de respuesta de extensión de probóscide (PER). A. durante un ensayo de entrenamiento. B. Durante el ensayo de evaluación.

El protocolo consistió en un entrenamiento espaciado de 4 ensayos separados por 5 minutos. En cada ensayo se presentó el olor (2-octanona o la mezcla 1-hexanol + acetofenona) a concentraciones alta ( $3 \cdot 10^{-2}$  M) o baja ( $3 \cdot 10^{-3}$  M) según el experimento. El olor fue presentado durante 4 segundos y en el último segundo del olor se recompensó a la abeja con una gota de  $0,5 \mu\text{l}$  de una solución azucarada (sacarosa 2 M) en las antenas y probóscide, lo que constituye una recompensa apetitiva. Se realizaron cuatro ensayos de entrenamiento espaciados por 10 minutos y luego se realizó un ensayo de evaluación que consistió en la presentación únicamente del olor de entrenamiento de modo tal de corroborar si hubo o no aprendizaje. El aprendizaje y reconocimiento del olor condicionados se evidencian cuando la abeja extiende la probóscide ante la sola presencia del olor condicionado anticipándose a la llegada de la recompensa. Si bien este tipo de aprendizaje es robusto existen efectos o tratamientos que pueden modificar esta fuerza asociativa. Uno de ellos es la extinción, que se da ante la presentación del estímulo condicionado sin el estímulo incondicionado y genera en una memoria que compite con la condicionada resultando en una reducción del valor predictivo del estímulo condicionado.

Para evitar esto, respetando un cronograma de un ensayo cada 10 minutos, se realizó un quinto ensayo de entrenamiento para contrarrestar un posible efecto de extinción provocado por el ensayo de evaluación.

Por último, se realizó un segundo ensayo de evaluación, pero esta vez a una concentración del olor distinta a la de entrenamiento. Este ensayo permite evaluar el grado de generalización entre las dos intensidades del mismo olor. Se toma como evidencia de generalización cuando el animal responde a ambas concentraciones del mismo olor y como discriminación cuando responde a la concentración de entrenamiento, pero no a la otra.

#### **2.4.2 Experimentos farmacológicos: Bloqueo de inhibiciones locales**

Para poner a prueba el papel que juega la inhibición GABAérgica en el lóbulo antenal en la generalización o discriminación entre dos concentraciones distintas de un mismo olor, se realizaron experimentos de condicionamiento y generalización utilizando la metodología explicada en 2.3.1 e inyectando de forma localizada en ambos lóbulos antenales 2nL de vehículo (PBS) o de los bloqueantes de GABA, Picrotoxina (GABA-A) 10µM y CGP (GABA-B) 100µM. Esta inyección fue realizada 10 minutos antes de comenzar con el entrenamiento (Figura 2.7).

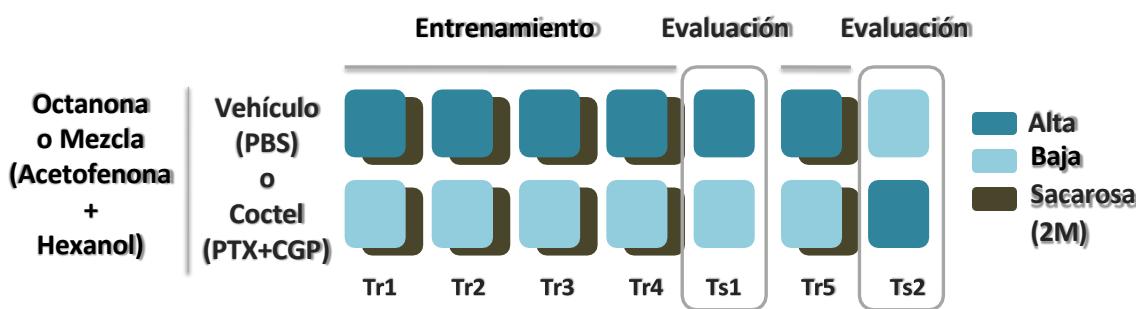


Figura 2.7 Esquema del diseño experimental utilizado para experimentos comportamentales de generalización de intensidades bajo bloqueo de las inhibiciones locales. Se nanoinyecta en el lóbulo antenal un coctel (PTX+CGP) o vehículo (PBS) 10 minutos previos al entrenamiento. El entrenamiento se compone

de cuatro ensayos con un intervalo entre ensayos de 10 minutos y un quinto ensayo entre las evaluaciones. Cada ensayo consiste en la presentación de un estímulo (Octanona o Mezcla de Acetofenona + Hexanol) a una concentración alta (azul) o baja (celeste) y, seguidamente la presentación de una gota de sacarosa 2M (gris). La evaluación consiste en la sola presentación del estímulo olfatorio. La primera evaluación se realiza a la concentración utilizada durante el entrenamiento y la segunda a la concentración opuesta.

Todas las soluciones inyectadas, vehículo y drogas, fueron preparadas con el colorante "Lucifer Yellow" que fluoresce cuando es iluminado con luz UV. Esto permitió monitorear durante la inyección que la misma fuera aplicada en forma localizada en el lóbulo antenal.

Para realizar la inyección localizada en los lóbulos antenales se hizo una apertura de forma rectangular en la cutícula de la zona dorsal de la cabeza, específicamente por debajo de las antenas hasta la altura del ocelo medial (Figura 2.8). Las inyecciones fueron realizadas mediante el inyector "Nanoliter 2010 inyector de WPI" y un micromanipulador manual guiado manualmente bajo lupa (Stopfer et al., 1997).

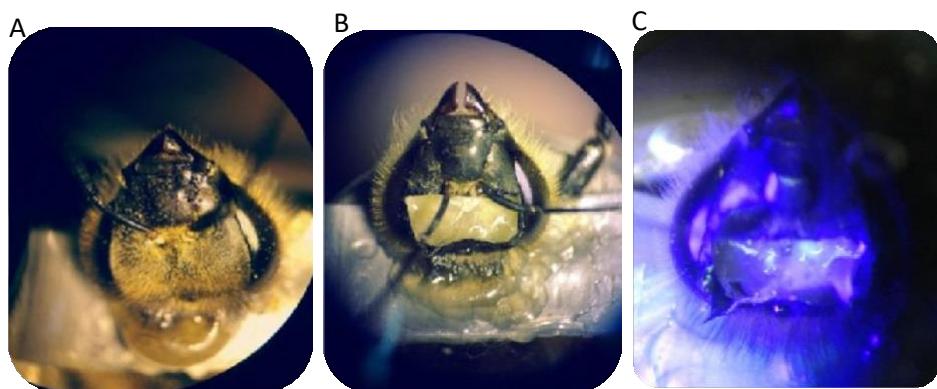


Figura 2.8 Nanoinyecciones en los lóbulos antenales. Vista bajo lupa de: A. Abeja con la cabeza fijada al cepo de experimentos comportamentales. B. Apertura rectangular en la cutícula en la que se exponen los lóbulos antenales. C. Monitoreo de nanoinyección en el lóbulo antenal con el colorante "Lucifer Yellow", flouresciendo bajo iluminación de luz UV.

Para los ensayos comportamentales se tuvieron en cuenta las respuestas de las abejas en su totalidad. Se evaluó qué porcentaje de abejas respondió en cada uno de los ensayos de entrenamiento, que porcentaje respondió en el primer ensayo de evaluación y que

porcentaje respondió en el segundo ensayo de evaluación. Para el análisis estadístico de las evaluaciones se realizaron pruebas de Chi cuadrado mediante el programa Statistics®.

### **3. Resultados**

Entender la relación entre la concentración de un olor y su codificación neuronal es fundamental para comprender la habilidad de los animales de reconocer la identidad del olor independientemente de su intensidad. Por ello el objetivo de esta primera sección es describir la representación neuronal de distintas concentraciones de un mismo olor.

Se utilizó la técnica de “Imaging de calcio” para medir actividad neuronal evocada por olor en el lóbulo antenal. Se trabajó con dos olores distintos para descartar que los resultados que hallados no fueran la solución particular de un único olor, sino que fuesen generalizables a diversos olores. Uno de ellos fue el odorante 2-octanona y el otro olor estuvo compuesto por una mezcla binaria de partes iguales de 1-hexanol y acetofenona. Los tres odorantes utilizados constituyen componentes de aromas florales de los cuales se sabe de antemano que las abejas perciben y discriminan entre sí. Se utilizó una mezcla como uno de los olores, debido a que los olores que los animales están preparados para percibir y reconocer en la naturaleza son en general mezclas de varias moléculas.

#### **3.1 Representación dependiente de la concentración**

Medimos actividad evocada por olores en neuronas de proyección del lóbulo antenal. Estas neuronas constituyen las primeras interneuronas del sistema olfatorio en insectos ya que reciben información de las neuronas sensoriales olfativas y envían información acerca de la presencia e identidad de olores a otras áreas del cerebro (ver figura 1.3 Introducción)

Las imágenes analizadas corresponden a la actividad de glomérulos dorsales del lóbulo antenal los cuales están inervados por neuronas de proyección de tipo uniglomerular (Kirschner et al., 2006) La actividad medida de esta manera representa la información saliente del lóbulo antenal.

Se midió actividad en 8 abejas y en cada una de ellas se consideraron para el análisis 15 regiones de interés que se corresponden a 15 glomérulos de identidad no determinada.

Las 15 áreas fueron seleccionadas en base a información anatómica, para verificar que cada región correspondiera a un glomérulo, y en base a información funcional seleccionando aquellas regiones que mostraran respuesta para al menos alguno de los dos olores en alguna de las concentraciones utilizadas.

La Figura 3.1 muestra imágenes obtenidas de un animal representativo. En falso color se revelan regiones de activación del lóbulo antenal durante la estimulación con olor. Se muestran patrones de actividad evocados por 2-octanona y por la mezcla de 1-hexanol + acetofenona a los 600 ms después de la estimulación para un barrido de concentraciones que corresponde a las diluciones 3/10 a 3/10000 (ver materiales y métodos). Cada olor a cada concentración fue medida por duplicado en cada animal. Los cuadrados en blanco sobre la figura señalan las 15 regiones de interés que fueron consideradas para el análisis en ese animal.

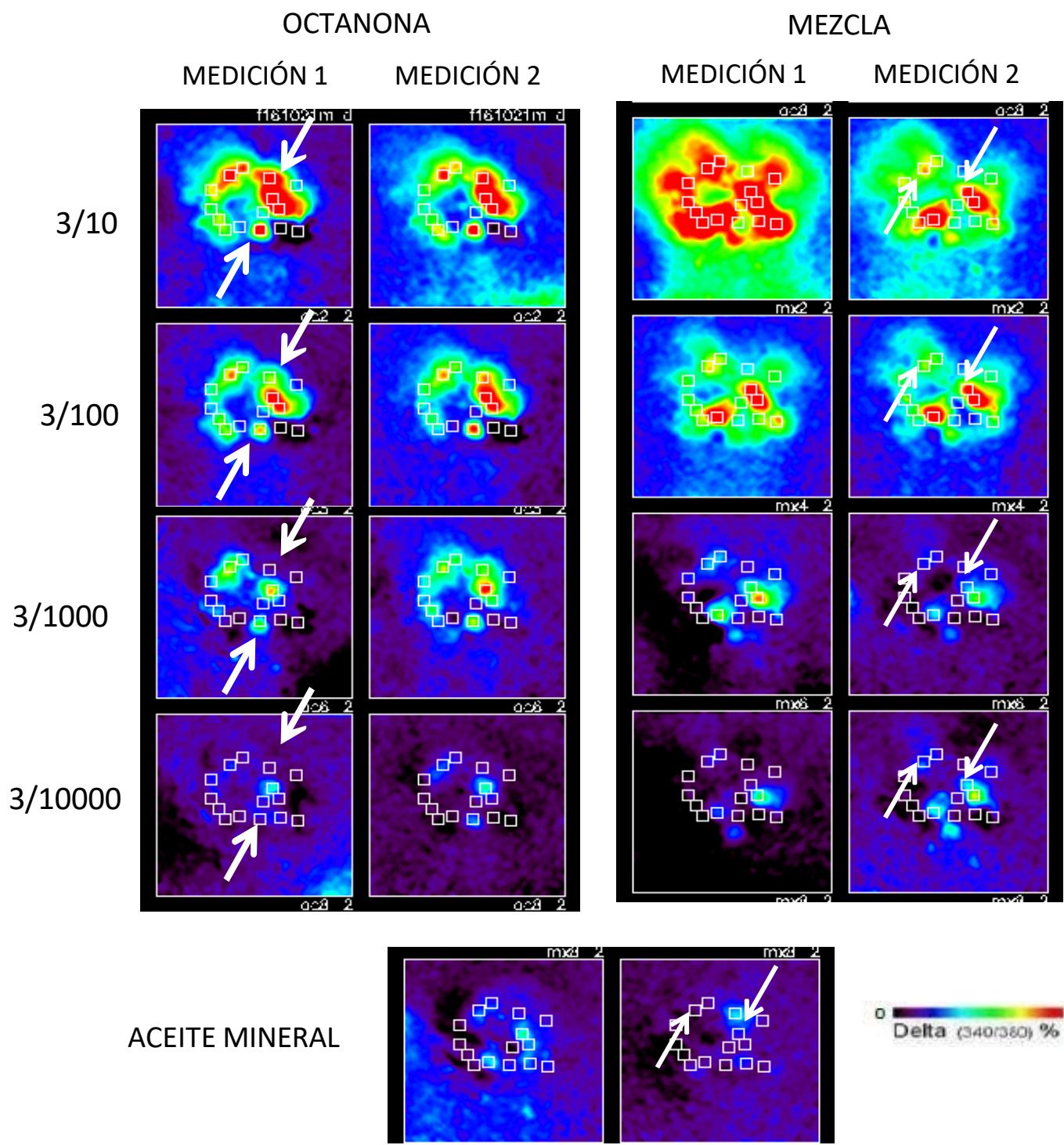


Figura 3.1 Patrones de actividad evocada por olor en un animal representativo. En el margen superior se indican los olores utilizados como estímulos, 2-octanona y la mezcla de acetofenona+1-hexanol. Se realizaron mediciones por duplicado. En el margen izquierdo se indican las concentraciones utilizadas para cada uno de los odorantes (indicado como dilución del olor en aceite mineral). Los cuadrados blancos corresponden a las 15 regiones de interés seleccionadas en ese animal. La intensidad de la respuesta expresada como Delta F (340/380) se indica en la escala de falso-color en el margen inferior derecho. Las flechas permiten seguir el cambio en la actividad de glomérulos en función de la concentración. Se observa que tanto la intensidad como el número de glomérulos reclutados incrementa con la concentración.

La inspección visual del animal en la figura 3.1 comparando la primer y segunda columna para cada olor permite apreciar el grado de reproducibilidad de las mediciones para ambos olores y para todas las concentraciones. También se puede observar que a medida que aumenta la concentración son reclutados más glomérulos y estos presentan también mayores niveles de actividad. Las flechas señalan algunos de los glomérulos sobre los cuales resulta evidente el efecto de la concentración.

Se observa también que los patrones de actividad son marcadamente diferentes para cada uno de los olores. Esto refleja la afinidad de los olores por distintos receptores.

Si bien los patrones de actividad evocados por ambos olores son distintos, en ambos casos se observa una relación directa entre la concentración y la intensidad de la respuesta. Esto permitirá evaluar los resultados obtenidos en términos de cambios en la intensidad de manera independiente de las características particulares de cada olor utilizado.

### **3.2 Cuantificación de los cambios en la representación**

Cada medición de imaging de calcio constó de un registro de 50 cuadros obtenidos a una tasa de adquisición de 5hz. La duración total de cada registro fue de 10 segundos y la estimulación con olor estuvo presente 4 segundos desde el cuadro 15 al 35 (ver figura 3.2 y 3.3 recuadro gris en cada uno de los gráficos).

Las figuras 3.2 y 3.3 muestran los resultados de un animal representativo en el que se midió actividad evocada por 2-octanona y por la mezcla binaria. En la figura se aprecia el detalle temporal de la actividad evocada por los olores a distintas concentraciones. Cada uno de los trazos corresponde a una de las 15 regiones de interés seleccionadas. El color de cada trazo a lo largo de las cuatro concentraciones corresponde al mismo glomérulo. Como puede observarse, la actividad evocada alcanza un máximo antes de cumplirse un segundo de la estimulación con el olor y luego decrece lentamente a pesar de que el olor esté aún presente.

Mediciones comportamentales previas muestran que las abejas expresan la decisión de responder o no, dentro de un segundo desde que se inició el olor. Por ello, en el análisis

subsiguiente se considera como actividad representativa del olor, el promedio de actividad medida en el primer segundo desde iniciado la estimulación (recuadro amarillo en figuras 3.2 y 3.3).

Los paneles de la derecha de la figura 3.2 y 3.3 muestran el promedio de actividad de cada glomérulo durante el primer segundo desde el inicio del olor. Con el objeto de hacer visibles las diferencias en la representación de las distintas concentraciones de olor, se ordenaron los glomérulos desde el más respondiente al menos respondiente según la concentración más alta (3/10) y el mismo orden de glomérulos fue repetido en las concentraciones menores. Este ordenamiento pone en evidencia que la contribución relativa de cada glomérulo al patrón de actividad depende de la concentración, ya que como puede observarse los patrones cambian paulatinamente conforme cambia la concentración del olor.

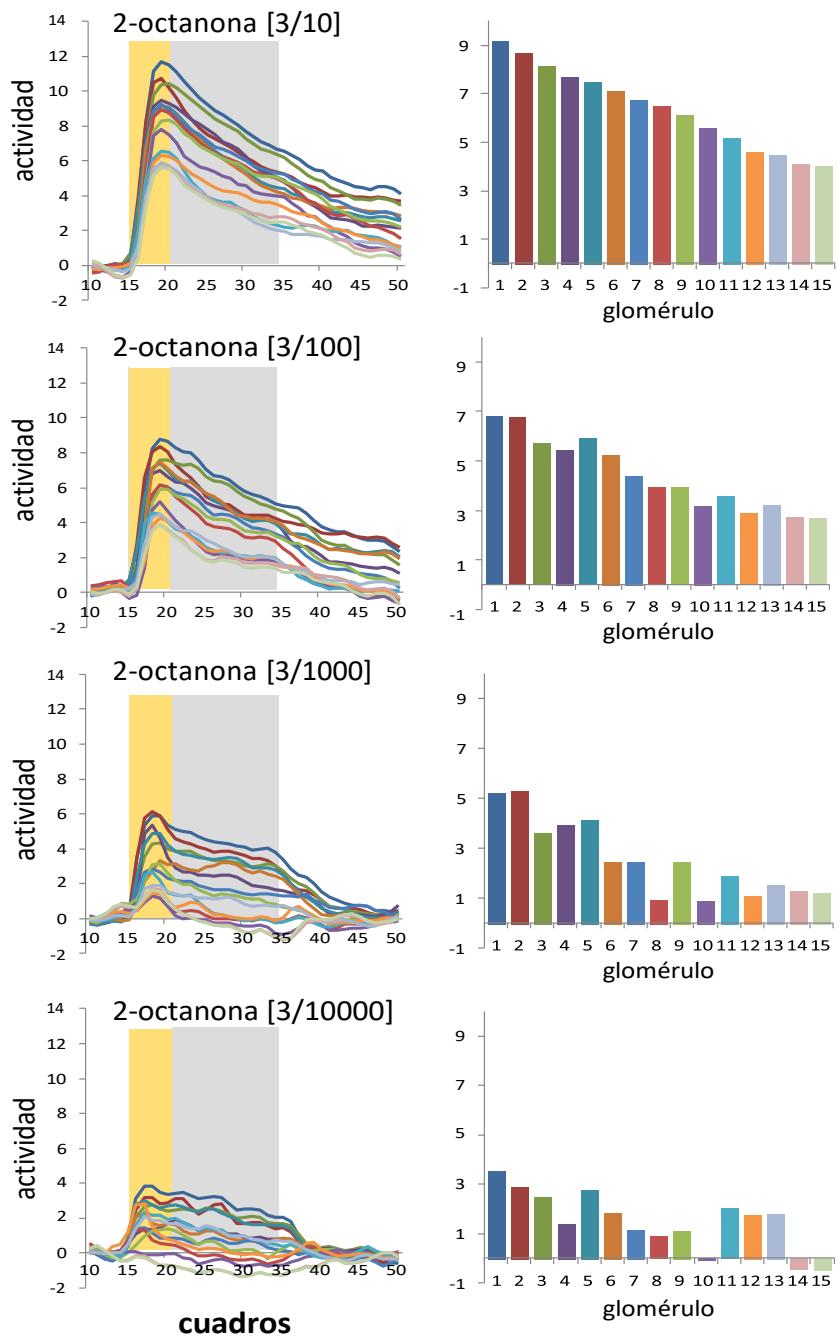


Figura 3.2 Registro en un animal representativo. Se muestra el detalle temporal de la actividad evocada por 2-octanona en 15 regiones de interés para cuatro concentraciones distintas. En el panel de la izquierda se observa la actividad evocada cuadro a cuadro. La actividad de calcio fue calculada como  $\Delta F_{340/380}$  (ver materiales y métodos). El recuadro gris simboliza 4 segundos de estimulación con olor a la concentración indicada. El recuadro amarillo simboliza el periodo en el cual la actividad se promedió para generar los gráficos del panel de la derecha. El número y orden de los glomérulos no indica su identidad neuroanatómica, sino el orden asignado en base al ranking de respuesta para la concentración más alta de 2-octanona. Se observa que el patrón de activación no es exactamente el mismo para todas las concentraciones puesto a medida que la concentración del olor disminuye se pierde el orden decreciente en los niveles de activación de cada glomérulo.

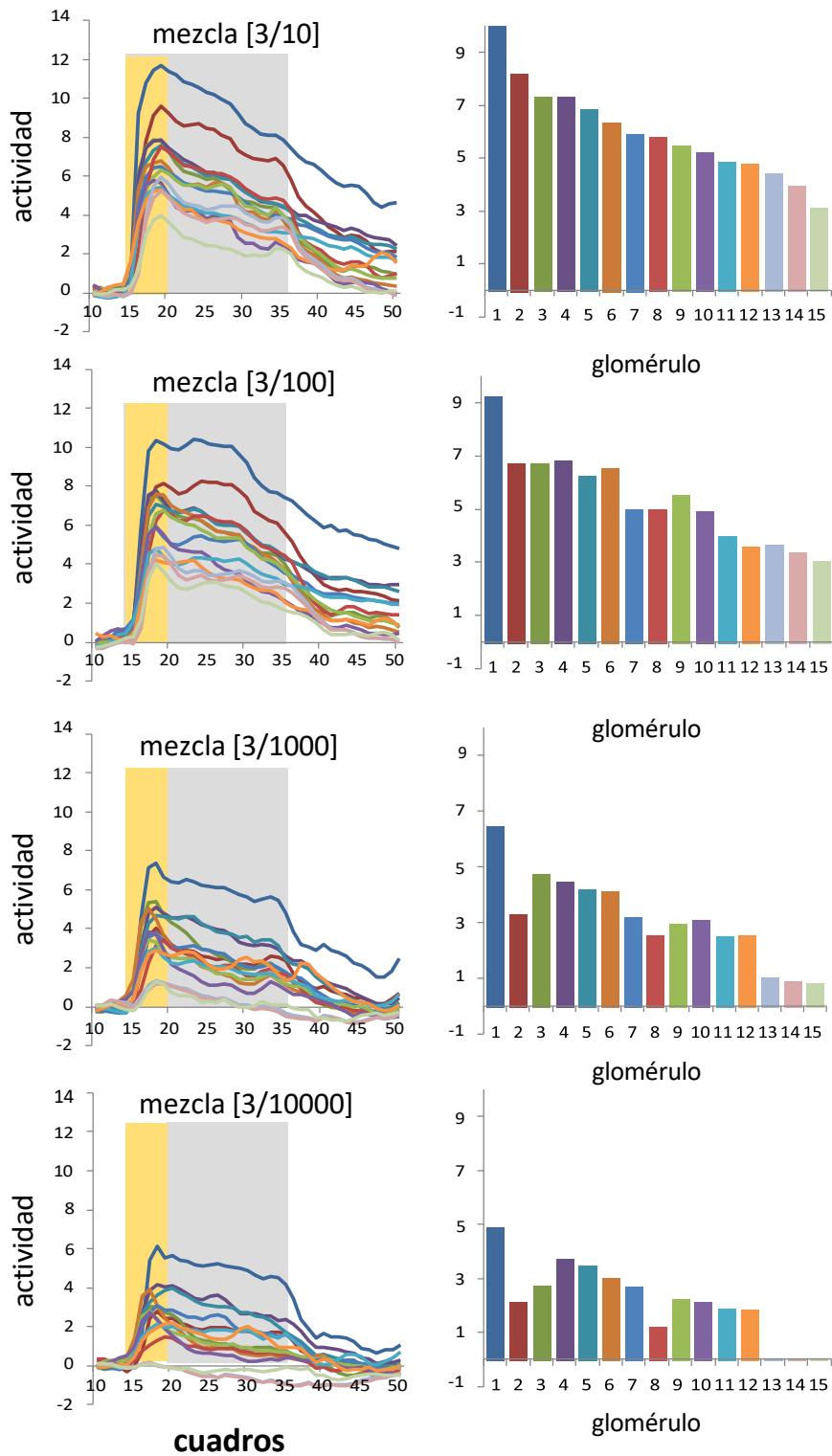


Figura 3.3 Registros correspondientes a la actividad evocada por la mezcla binaria 1-hexanol+acetofenona para el mismo animal de la figura 3.2. El orden y color de los glomérulos de izquierda a derecha corresponde al ordenamiento según el ranking de respuesta a la mezcla y por lo tanto no coincide con el orden mostrado en la figura 3.2 para 2-octanona. De nuevo la actividad en concentraciones crecientes no solo aumenta los niveles de actividad, también cambia la configuración del patrón.

En las figuras 3.2 y 3.3 puede observarse que independientemente del olor utilizado, la actividad evocada aumenta a medida que aumenta la concentración del estímulo. La evolución de los patrones de actividad en función de la concentración se resume en la figura 3.4

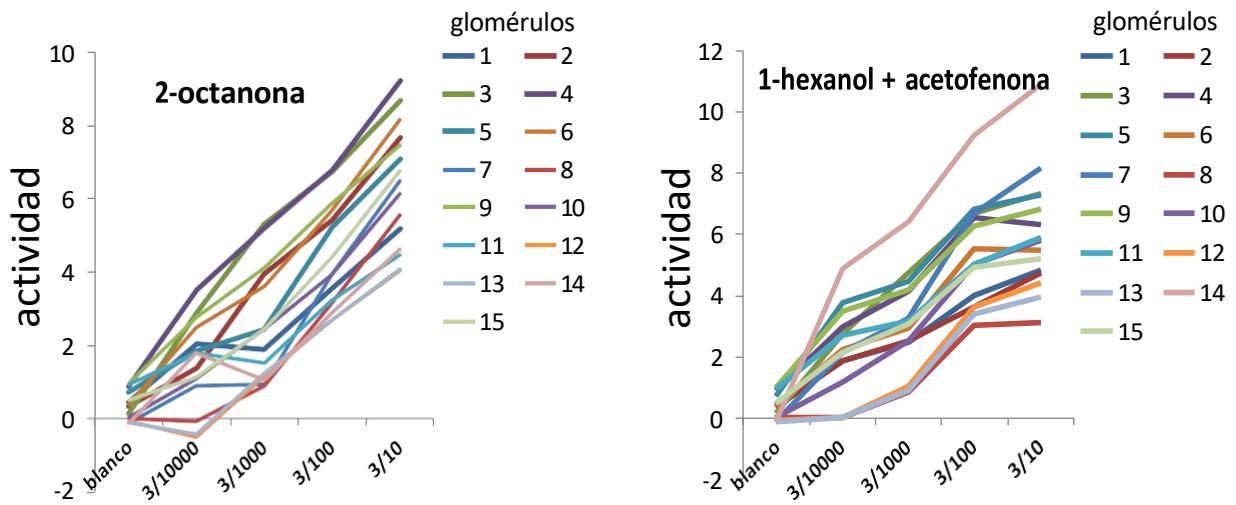


Figura 3.4 Resumen de la actividad en el animal ejemplificado en las figuras anteriores. Cada uno de los trazos corresponde a la actividad evocada en un glomérulo como función de la concentración de 2-octanona (izquierda) y la mezcla binaria 1-hexanol+acetofenona (derecha).

Si bien a grandes rasgos se observa que la actividad aumenta de manera generalizada a medida que aumenta la concentración de los olores, también podemos observar que las curvas de distintos glomérulos se cruzan (tal como se muestra en el hecho de que los patrones van cambiando en el panel derecho de las figuras 3.2 y 3.3) y que no todos los glomérulos aumentan con la misma pendiente. También podemos comprobar que a medida que aumenta la concentración del olor aumenta la cantidad de glomérulos reclutados.

### **3.3 Estabilidad y especificidad de la representación de olores**

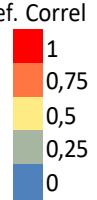
En el siguiente análisis se discute acerca de en qué medida los cambios observados en función de la concentración alteran cualitativamente la representación de los olores. Como medida de estabilidad o de cambio de los patrones de actividad se calculan los coeficientes de correlación entre patrones de actividad evocados por distintas concentraciones y distintos olores.

Para este análisis se utiliza el promedio del primer segundo de la actividad evocada por la estimulación con el olor (paneles derechos de las figuras 3.2. y 3.3). Dado que de cada animal se midió la actividad evocada por el blanco (sin olor) y por cuatro concentraciones distintas de dos olores, se tienen un total de 36 posibles correlaciones que comprenden 8 correlaciones entre el blanco y los 8 olores, 16 que corresponden a la combinación de las 4 concentraciones de cada olor con las 4 del otro olor y dos veces 6 que corresponden a los pares de las distintas concentraciones dentro de cada uno de los dos olores.

La tabla 3.1 resume todas las posibles correlaciones que describen el grado de estabilidad de la representación en un animal de cada olor a distintas concentraciones y las diferencias entre patrones evocados por distintos olores. A su vez se muestra la correlación entre los patrones de actividad evocado por olor y por el solvente aceite mineral.

Tabla 3.1 La tabla se lee como un cuadro de doble entrada en el que cada celda indica el coeficiente de correlación obtenido entre los patrones de activación evocados en un animal por el olor indicado en el nombre de la fila y el olor indicado en el nombre de la columna. El color de la celda representa el grado de correlación, siendo roja la correlación=1 y azul la correlación=0. Ver tabla de colores a la derecha de la tabla.

	oct 3/10000	oct 3/1000	oct 3/100	oct 3/10		mix 3/10000	mix 3/1000	mix 3/100	mix 3/10
Blanco	0,666	0,506	0,532	0,424		0,466	0,299	0,128	0,004
oct 3/10000	0,777			0,736		0,752	0,728	0,591	0,466
	0,950			0,884		0,342	0,376	0,217	0,076
	0,970					0,436	0,450	0,330	0,175
	0,374					0,374	0,396	0,310	0,154
mix 3/10000	0,966								
	0,945								
	0,967								

coef. Correl  


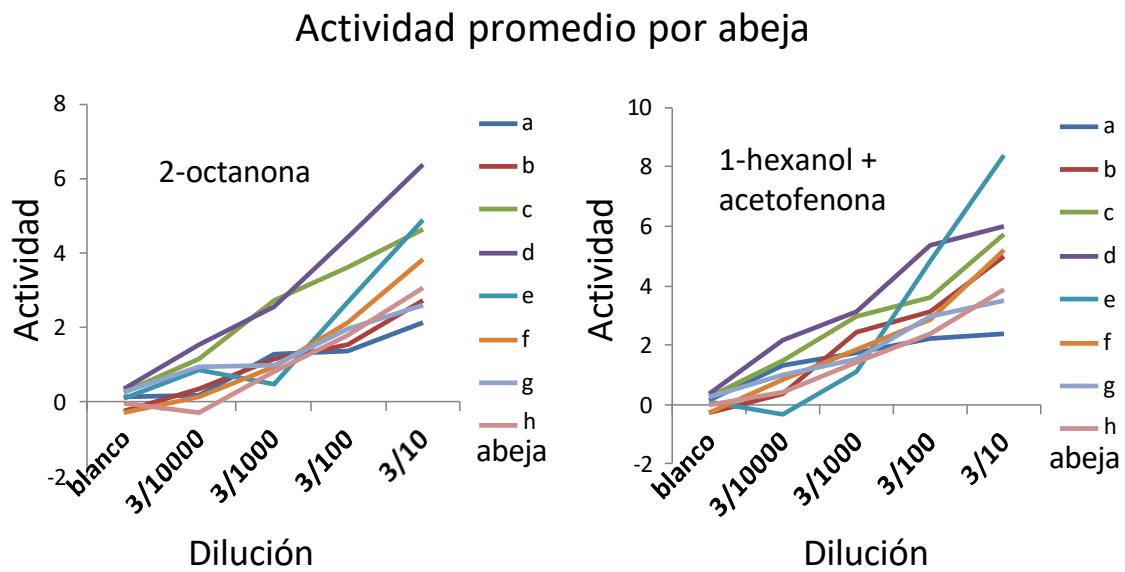
1
0,75
0,5
0,25
0

Si bien en las figuras anteriores se describen cambios de los patrones de actividad en función de la concentración de los olores, puede observarse según la tabla 3.1 el grado de estabilidad entre las distintas concentraciones de un mismo olor en contraste con las diferencias entre olores distintos (comparar celdas en color rojo vs. celdas en color beige y azul). Es de esperar que este grado de estabilidad en la correlación sea reflejado en el grado de generalización comportamental entre distintas concentraciones del mismo olor. También puede interpretarse en base a los coeficientes de correlación que a medida que aumenta la concentración de los olores, los patrones de cada olor son cada vez más distintos del otro olor (celdas en azul a la derecha de la tabla). Esta observación se condice con observaciones previas que indican mayor discriminación entre olores a mayor concentración (Wright y Smith, 2004).

### **3.4. Diferencias en los niveles de actividad no implican necesariamente diferencias en la estabilidad de los patrones**

Los resultados mostrados hasta aquí están basados en el análisis de los registros hechos sobre un animal y permiten ejemplificar el detalle de las diferencias en la actividad evocada por distintas concentraciones. La misma secuencia de análisis se repitió sobre el resto de los animales medidos.

Para comparar entre animales se promedió la actividad de las 15 regiones de interés dentro de cada animal, de modo de obtener una única curva por animal que muestre el nivel de actividad global en función de la concentración del olor. La figura 3.5 muestra estos resultados para cada animal.



**Figura 3.5** Análisis de la actividad global por animal. Cada trazo corresponde a la actividad promedio de las 15 regiones de interés de un animal en función de la concentración de 2-octanona y de la mezcla. Los trazos identificados por color y las letras de la “a” a la “h” corresponden a 8 abejas distintas. “blanco”: refiere a una estimulación que sólo contiene el solvente aceite mineral. El mismo color de trazo en el panel izquierdo y derecho indica que se trata de la misma abeja.

La figura 3.5 permite comprobar que, en todos los animales medidos, la actividad evocada por olor aumenta conforme aumenta la concentración del olor.

Para determinar en qué medida los patrones evocados por distintas concentraciones de un mismo olor retienen información suficiente para reconocer el olor y diferenciarlo de un olor distinto, se repitió la matriz de correlaciones para cada una de las abejas y luego se calculó una matriz promedio (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2** Correlaciones promedio. **Arriba:** Cada valor representa el promedio de la correlación entre los dos estímulos correspondientes a 8 abejas distintas. La tabla se lee igual que la tabla 3.1. El color de la celda representa el grado de correlación, según indica la escala de colores a la derecha de la tabla. **Abajo:** Los valores en cada celda son el error estándar de la correlación medida para cada una de las 8 abejas. Los valores en las celdas corresponden a la media indicada en la celda respectiva en la tabla de arriba.

PROMEDIO	oct 3/10000	oct 3/1000	oct 3/100	oct 3/10	mix 3/10000	mix 3/1000	mix 3/100	mix 3/10
Blanco	0,354	0,304	0,286	0,208	0,316	0,326	0,227	0,128
oct 3/10000		0,734	0,599	0,561	0,364	0,508	0,396	0,202
oct 3/1000			0,853	0,807	0,429	0,518	0,424	0,248
oct 3/100				0,919	0,369	0,421	0,462	0,359
oct 3/10					0,280	0,379	0,414	0,288
mix 3/10000						0,785	0,554	0,461
mix 3/1000							0,746	0,598
mix 3/100								0,832
SEM	oct 3/10000	oct 3/1000	oct 3/100	oct 3/10	mix 3/10000	mix 3/1000	mix 3/100	mix 3/10
Blanco	0,160	0,132	0,111	0,116	0,070	0,083	0,101	0,084
oct 3/10000		0,022	0,073	0,046	0,123	0,055	0,099	0,123
oct 3/1000			0,068	0,049	0,094	0,060	0,095	0,096
oct 3/100				0,034	0,086	0,076	0,091	0,076
oct 3/10					0,114	0,050	0,076	0,063
mix 3/10000						0,110	0,078	0,085
mix 3/1000							0,049	0,079
mix 3/100								0,059

coef. Correl  
  
 1  
 0,75  
 0,5  
 0,25  
 0

La tabla 3.2 indica un alto grado de estabilidad entre patrones de actividad evocada por distintas concentraciones de un mismo olor y en cambio se marca la diferenciación entre

los patrones de actividad evocada por olores distintos. Como grado de repetitividad de este resultado entre animales se muestra en la matriz inferior valores de error estándar, los valores pequeños obtenidos para todos los casos indica el grado de confianza de la matriz de correlación promedio.

Resulta interesante que los valores más altos de correlación corresponden a correlaciones entre los patrones evocados por concentraciones inmediatamente contiguas (ver diagonal de la matriz de la tabla 3.2).

Con el objeto de poner a prueba el grado de generalización comportamental entre distintas concentraciones de un mismo olor y estudiar en qué medida esto puede estar afectado por diferencias en la codificación, se vuelve al análisis de los resultados que indican cambios en la actividad global en función de la concentración. La figura 3.6 muestra la actividad promedio de ocho abejas en función de la concentración del estímulo para los dos olores evaluados. En base a estas curvas se eligen dos concentraciones para cada uno de los olores, tal que se pueda evaluar el grado de generalización comportamental entre ambas.

## Promedio de abejas

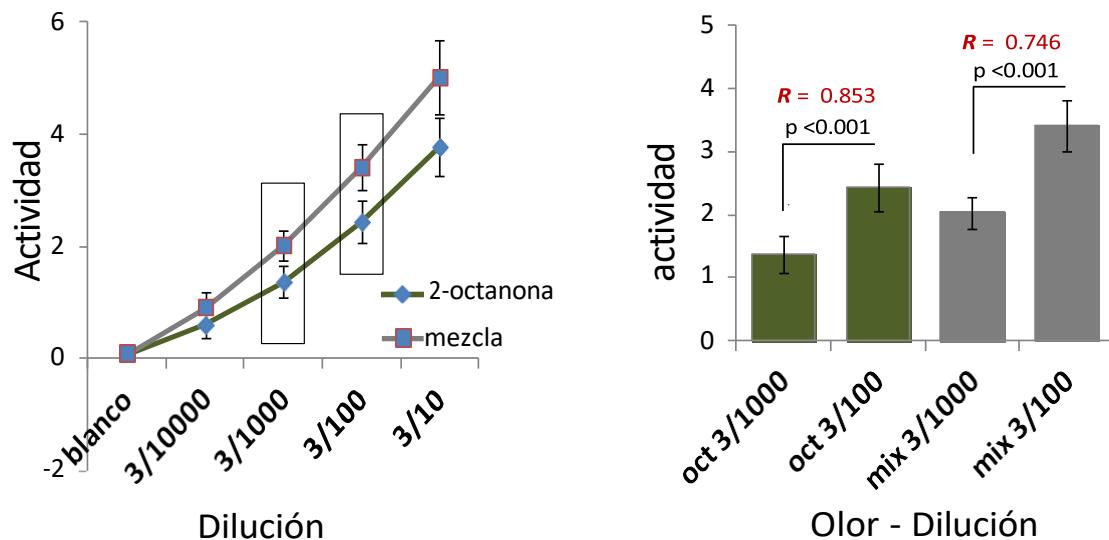


Figura 3.6 Efecto de la concentración sobre la intensidad de la actividad global evocada. Izquierda: Promedio y ES de ocho abejas. Derecha: Detalle de las concentraciones elegidas para los ensayos de la sección de comportamiento. Análisis estadístico. Los valores de P indicados corresponden a Pruebas de T de Student de muestras pareadas. N=8 abejas en ambos casos. “R” corresponde al promedio del coeficiente de correlación de Pearson calculado para los patrones de actividad medidos en cada una de las 8 abejas.

El panel derecho de la figura 3.6 muestra el detalle de actividad global evocada por 2-octanona y por la mezcla a concentraciones que difieren en un orden de concentración. Como indican los valores de significancia en la figura de la derecha, la intensidad en la actividad global evocada difiere significativamente entre ambas concentraciones para ambos olores. Sobre los respectivos pares de columnas se indica el coeficiente de correlación calculado entre los patrones de actividad correspondientes.

En la siguiente sección se analizará la habilidad de los animales de generalizar entre esas dos concentraciones, que, si bien muestran un alto grado de correlación, difieren significativamente en la intensidad de las respuestas evocadas.

Analizaremos el grado de generalización de la concentración alta (3/100) hacia la baja (3/1000) y viceversa en condiciones normales y, con el objetivo de exponer el rol de GABA

en el control de ganancia y la generalización, bloqueando las inhibiciones GABAérgicas en el lóbulo antenal.

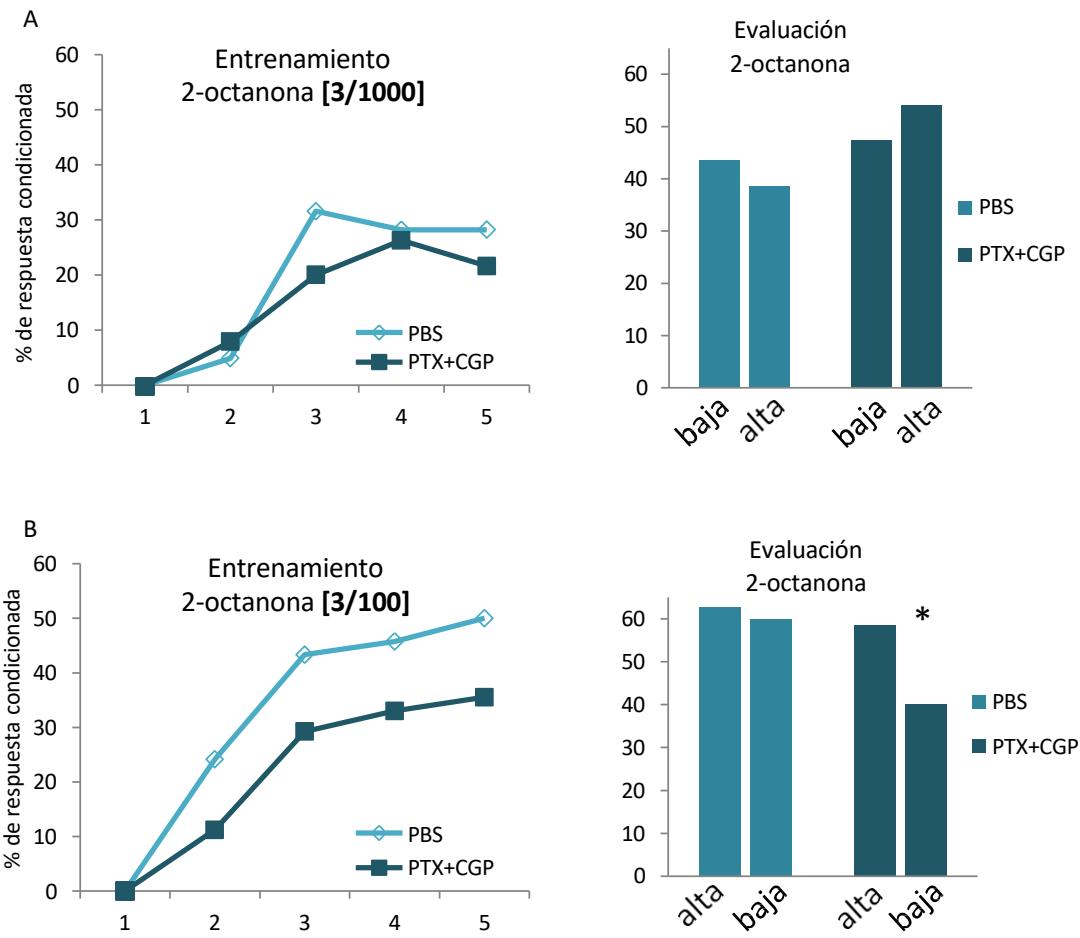
### **3.5 Generalización comportamental entre concentraciones**

En esta sección se estudia la generalización comportamental entre las dos concentraciones de 2-octanona y entre las dos concentraciones de la mezcla (1-hexanol+acetofenona). Además, se investiga si las inhibiciones locales en lóbulo antenal juegan un papel relevante en la generalización entre las distintas concentraciones del mismo olor.

Para evaluar la generalización entre intensidades de un mismo olor, fue primero necesario que los animales respondan a dicho olor. Para ello, se realizó un protocolo de condicionamiento clásico (ver Materiales y métodos (2.4.2)) en el cual las abejas fueron entrenadas a responder al olor recompensado con solución de sacarosa. Una vez terminado el entrenamiento las abejas fueron evaluadas con el olor a la concentración con la que fueron entrenadas y luego evaluadas con el mismo olor, pero a una concentración distinta.

Dado que una pregunta central en este trabajo es si la red inhibitoria del lóbulo antenal contribuye a la generalización entre concentraciones, los animales fueron inyectados localmente en los lóbulos antenales con vehículo o con un coctel de bloqueantes de receptores de GABA antes del ensayo de comportamiento.

Las figuras 3.7 muestra las curvas de entrenamiento y los resultados de la sesión de testeo para las dos concentraciones de 2-octanona.



**Figura 3.7** Curvas de entrenamiento y porcentaje de animales que muestran respuesta condicionada durante la sesión de evaluación (testeo). Se muestran por separado los resultados de individuos inyectados con vehículo (PBS) o con el coctel de bloqueantes de GABA (PTX+CGP). **A.** Entrenamiento con octanona a concentración baja (3/1000). Ensayo de evaluación con la concentración baja y luego alta (3/100). El grado de generalización se comprueba al comparar la frecuencia de respuesta a ambas concentraciones durante el testeo. ( $p_{PBS}=0,6452$ ;  $p_{PTX+CGP}=0,5626$ ),  $N_{PBS}=39$ ;  $N_{PTX+CGP}=37$ . **B** Entrenamiento con 2-octanona a concentración alta (3/100) y luego testeo a concentración alta y baja (3/1000). La comparación estadística se basa en una evaluación de Chi2 entre las frecuencias de respuesta para las dos concentraciones durante el testeo ( $p_{PBS}=0,7613$ ;  $p_{PTX+CGP}=0,0320$ ),  $N_{PBS}=60$ ;  $N_{PTX+CGP}=70$ .

Las curvas de entrenamiento de la figura 3.7 muestran la adquisición de la respuesta condicionada ante 2-octanona para las dos concentraciones utilizadas. En todos los casos se observan curvas de adquisición levemente más lentas que lo reportado normalmente en la bibliografía de abejas (Klappenbach et. al, 2013). Esta diferencia puede adjudicarse a que la manipulación y la inyección intracerebral afecte el estado general de algunos

individuos y la motivación por obtener la recompensa. En el caso del entrenamiento con la concentración alta (3/100) se observa además que la inyección con bloqueantes de GABA retarda la curva de adquisición. Dado que este efecto no se evidencia en la sesión de evaluación, interpretamos que la diferencia en el entrenamiento no se debe a una menor taza de aprendizaje, sino a un enlentecimiento de la respuesta ante el olor. Este efecto no se evidenciaría en el ensayo de evaluación en el que no hay recompensa y por lo tanto el animal tiene más tiempo para responder.

Para independizarse de posibles efectos del tratamiento sobre el aprendizaje, la evaluación de la generalización entre concentraciones estuvo enteramente basada en la respuesta durante la sesión de testeo. Para ello se comparó el número de animales que respondió a la concentración de entrenamiento con el número de animales que respondió a la concentración nueva, sea esta última más alta o más baja. Estos resultados se muestran en el panel de la derecha de la figura 3.7. En el caso de animales inyectados con PBS pudo comprobarse un altísimo grado de generalización entre las concentraciones alta y baja independientemente de la dirección del ensayo. Este grado de generalización era esperable teniendo en cuenta los coeficientes de correlación entre patrones de actividad evocada por las distintas concentraciones, pero no así en base a las diferencias en la intensidad general del patrón.

El perfil de generalización entre concentraciones está alterado en los animales inyectados con los bloqueantes de GABA. La figura muestra un efecto asimétrico del bloqueo de GABA sobre la generalización ya que no altera la generalización de baja a alta concentración, pero si disminuye la generalización de alta a baja concentración [Chi2:(P<sub>PTX+CGP</sub> = 0,0320)]. Estos resultados coinciden en parte con la hipótesis de este trabajo que expresa que la actividad de GABA en el lóbulo antenal contribuye a estabilizar patrones de olor a lo largo de concentraciones.

Con el objetivo de probar que el efecto de los bloqueantes de GABA sobre la generalización, no fuese un caso particular propio del patrón de 2-octanona, sino generalizable a otros olores, se repitió el mismo experimento con la mezcla 1-

hexanol+octanona. La figura 3.8 muestra las curvas de aprendizaje y el perfil de generalización entre distintas concentraciones de la mezcla.

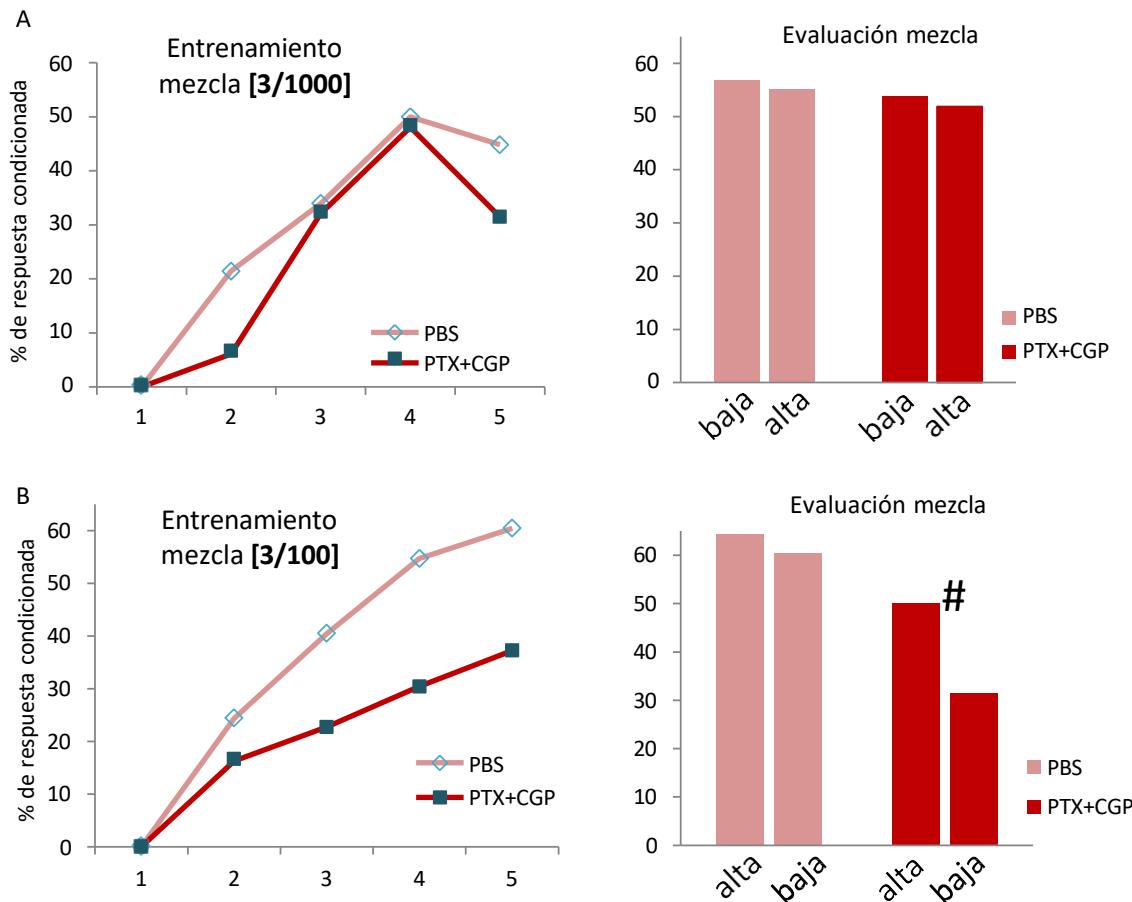


Figura 3.8 Curvas de entrenamiento y porcentaje de respuesta condicionada durante la evaluación. Se muestran por separado los resultados de individuos inyectados con vehículo (PBS) o con el coctel de bloqueantes de GABA (PTX+CGP). A. Entrenamiento con mezcla de acetofenona+1-hexanol a concentración baja (3/1000) ( $p_{PBS} = 0,8516$ ;  $p_{PTX+CGP} = 0,8371$ )  $N_{PBS} = 58$ ;  $N_{PTX+CGP} = 54$ . B. Entrenamiento con la mezcla acetofenona+1-hexanol a concentración alta (3/100) ( $p_{PBS} = 0,7162$ ;  $\# p_{PTX+CGP} = 0,0617$ )  $N_{PBS} = 43$ ;  $N_{PTX+CGP} = 51$ .

La figura 3.8 deja ver para la mezcla un perfil de aprendizaje y generalización similar al de 2-octanona. Si bien el efecto del coctel no llega a ser significativo [ $\text{Chi2}$  ( $p_{PTX+CGP} = 0,0617$ )] la tendencia repite los resultados obtenidos con 2-octanona.

Considerando que los dos olores mostraron un perfil de generalización similar e igualmente afectados por los bloqueantes de GABA se agruparon los datos en la figura 3.9.

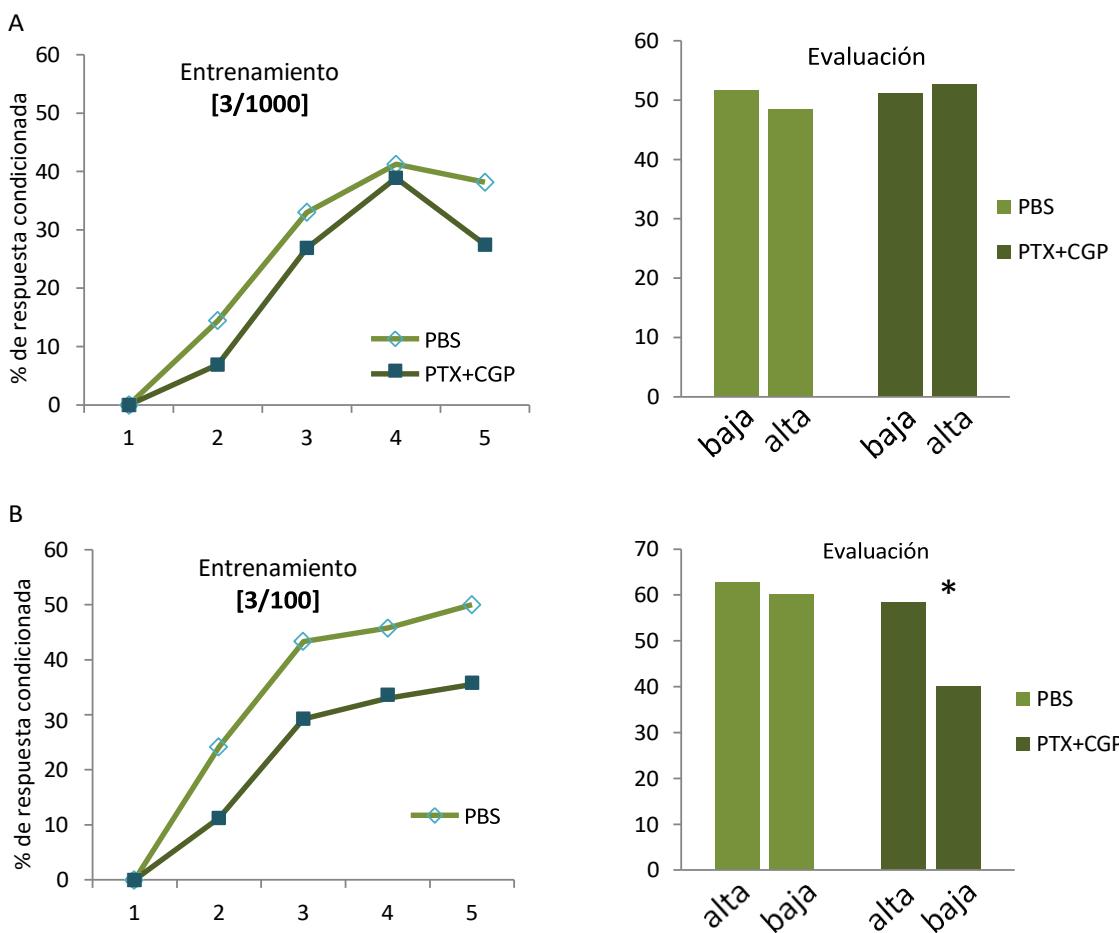


Figura 3.9 Curvas de entrenamiento y frecuencia de respuesta condicionada durante la evaluación. Se muestran por separado los resultados de individuos inyectados con vehículo (PBS) o con el coctel de bloqueantes de GABA (PTX+CGP). A. Abejas entrenadas a concentración baja ( $p_{PBS} = 0,6666$ ;  $p_{PTX+CGP} = 0,8257$ ,  $N_{PBS} = 97$ ;  $N_{PTX+CGP} = 91$ . B Entrenadas a concentración alta ( $p_{PBS} = 0,6411$ ; \*  $p_{PTX+CGP} = 0,0045$ )  $N_{PBS}= 103$ ;  $N_{PTX+CGP} = 121$ .

Al agrupar los datos de todos los individuos según la concentración con la que han sido entrenados, baja (3/1000) o alta (3/100), independientemente del olor utilizado, se verifica el efecto de los bloqueantes GABA sobre la generalización de alta a baja pero no de baja a alta [Chi2 ( $p_{PTX+CGP} = 0,0045$ ).

Los resultados obtenidos refuerzan la idea de que la generalización se ve afectada bajo el tratamiento con bloqueantes de GABA en el lóbulo antenal. Sin embargo, el efecto se da sólo si se evalúa la generalización de una concentración alta hacia una concentración baja y no a la inversa. Esta asimetría respecto a la incidencia de las inhibiciones gabaérgicas en la generalización comportamental de los individuos resulta interesante y requiere de estudios más profundos que los que pude abordar esta tesis. No obstante, en la discusión de este trabajo se abordan posibles hipótesis que podrían aportar a la explicación de este fenómeno.

## **4. Discusión**

A lo largo de esta tesis de licenciatura se estudió el fenómeno de generalización entre estímulos olfatorios que consisten en el mismo odorante a distinta concentración. Se evaluó si la inhibición en el lóbulo antenal juega un rol en la generalización entre distintas intensidades del mismo olor. Este análisis fue abordado en base a la descripción de los patrones de actividad evocados en neuronas de proyección del lóbulo antenal y completado con un análisis de la generalización comportamental entre ambas concentraciones.

### **4.1 Ensayos de Imaging de Calcio**

Los ensayos de imaging de calcio sobre la actividad evocada con un odorante puro y con una mezcla binaria a concentraciones crecientes aportaron detalle a nuestro conocimiento previo sobre la codificación de distintas concentraciones de olor (Marachlian, tesis de doctorado, UBA).

En su conjunto, los resultados muestran que a mayor concentración del odorante se observa mayor intensidad de respuesta y se reclutan mayor cantidad de glomérulos. Sin embargo, a pesar de los cambios mencionados, los patrones de actividad a distinta concentración evidencian mantener la información suficiente y necesaria para permitir el reconocimiento del olor. Esto se deduce, por un lado, por el alto grado de correlación entre los patrones de actividad evocados por el mismo olor a distintas concentraciones, y por otro, por los resultados de comportamiento que muestran una generalización completa entre las dos concentraciones evaluadas. En este sentido, fue muy importante en este trabajo haber hecho una descripción detallada de los patrones de actividad evocados exactamente por los mismos olores y concentraciones que luego fueron evaluados en los ensayos de comportamiento. Este abordaje permitió establecer una vinculación directa entre el comportamiento observado y la codificación de los olores. Tal es así, que de las variables evaluadas que describen la relación entre patrones de actividad evocada, podríamos decir que el coeficiente de correlación entre dos patrones resulta mejor predictor de generalización que la diferencia en la intensidad global del patrón.

También se observó que a medida que aumenta la concentración disminuye la correlación entre los patrones de actividad evocados por olores distintos. Esto último quedó en evidencia en las tablas de correlación donde se muestra que el aumento de concentración incrementa la diferencia entre los patrones evocados por 2-octanona y por la mezcla de 1-hexanol+acetofenona. Esta observación resulta consistente con hallazgos previos que reportan que la discriminación comportamental entre dos olores aumenta con la concentración de los olores (Wright y Smith, 2004) y estudios que han comprobado que menores grados de correlación entre patrones predicen mayor discriminación entre los mismos (Chen et al., 2015; Locatelli et al., 2016; Güerrieri et al., 2005).

## **4.2 Ensayos Comportamentales**

Por medio de experimentos de condicionamiento clásico pudo evaluarse el grado de generalización comportamental entre distintas intensidades de un mismo odorante y el papel de las inhibiciones locales dentro del lóbulo antenal en este tipo de generalización. El diseño experimental propuesto permitió separar el fenómeno de generalización de diferencias en el nivel de aprendizaje. Para ello los animales fueron entrenados y el primer ensayo de evaluación fue realizado con la misma concentración utilizada durante el entrenamiento. Luego los animales fueron evaluados con la nueva concentración. De este modo el grado de generalización entre ambas concentraciones fue evaluado comparando estrictamente la probabilidad de respuesta en los dos ensayos de evaluación independizándose así del nivel absoluto del aprendizaje alcanzado.

Los resultados en animales inyectados con vehículo mostraron un nivel total de generalización, consistente con lo esperado en base a los altos grados de correlación entre los respectivos patrones de actividad. Respecto del efecto de los bloqueantes sobre la generalización se observó de manera consistente para los dos olores, que el bloqueo de GABA afecta la generalización de alta a baja concentración pero no de baja a alta.

Estos resultados son en parte esperables, ya que mediciones previas realizadas en el laboratorio indican que los bloqueantes de GABA afectan la representación de los olores haciendo a los patrones más dependientes de la intensidad del estímulo y exagerando las

diferencias entre concentraciones (Tesis doctoral, Emiliano Marachlian 2015). Los resultados obtenidos están de acuerdo con la hipótesis expresada en este trabajo, que la inhibición dentro de lóbulo antenal juega un rol fundamental entre los mecanismos de control de ganancia que estabilizan la codificación de olores y permiten el reconocimiento de olores en un amplio rango de concentraciones.

El hecho de que el bloqueo de los receptores de GABA no afecte la generalización de baja a alta concentración sugiere que los mecanismos que subyacen la generalización en un sentido y en otro no dependen solo de relaciones simétricas como pueden ser la distancia euclídea o la correlación entre dos patrones. De hecho, relaciones asimétricas de generalización/discriminación entre pares de olores han sido reportadas en diversas ocasiones lo cual sugiere que existen algoritmos para generalización que son compatibles con la idea de inclusión o de enmascaramiento de un patrón dentro de otros, más que con relaciones reciprocas como ser el coeficiente de correlación (Locatelli y Rela, 2014; Rokni et al., 2014). En este sentido deberá probarse en adelante un batería más grande olores y concentraciones que deberán ser estudiadas en el detalle de su representación neuronal y de su generalización comportamental para descifrar cual es la relación entre patrones que indica si dos olores o concentraciones son percibidas o no como el mismo estímulo.

En resumen, comprobamos que las inhibiciones gabaérgicas dentro del lóbulo antenal contribuyen al perfil de generalización entre distintas intensidades. En una serie de experimentos en curso estamos ahora estudiando el grado de afección de los bloqueantes sobre la representación de 2-octanona y la mezcla en las concentraciones utilizadas en los experimentos de comportamiento. Esos resultados permitirán comprender mejor que aspecto del estímulo a alta concentración hace a este igual al de baja concentración, y que aspecto del estímulo de baja concentración hace a este distinto al de alta concentración cuando se bloquea la inhibición.

## Referencias bibliográficas

- Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., & Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of comparative psychology*, 97(2), 107.
- Chen JY, Marachlian E, Assisi C, Huerta R, Smith BH, Locatelli F, Bazhenov M.(2015) Learning modifies odor mixture processing to improve detection of relevant components.J Neurosci. 2015 Jan 7;35(1):179-97.
- Free, J. B. (1987). *Pheromones of social bees*. Chapman and Hall.
- Garcia J, Koelling R. (1966). Relation of cue to consequence avoidance learning. Psychon. Sci., 1966, Vol. 4: (123-124).
- Gottfried, J. A. (2010). Central mechanisms of odour object perception. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(9), 628-641.
- Guerrieri F, Schubert M, Sandoz JC, Giurfa M. Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. PLoS Biol. 2005 3(4):e60.
- Hallem, E. A., Ho, M. G., y Carlson, J. R. The molecular basis of odor coding in the drosophila antenna. 2004 *Cell*, 117(7):965-979.
- Locatelli F, Rela L. Mosaic activity patterns and their relation to perceptual similarity: open discussions on the molecular basis and circuitry of odor recognition. *J Neurochem*. 2014 Aug 13.
- Locatelli FF, Fernandez PC, Smith BH. Learning about natural variation of odor mixtures enhances categorization in early olfactory processing. *J Exp Biol*. 2016 ;219 (Pt 17):2752-62.
- Klappenbach M, Kaczer L, Locatelli F (2013). Dopamine interferes with appetitive long-term memory formation in honey bees. *Neurobiol Learn Mem*. 2013 Nov;106:230-7.
- Marachlian, Emiliano. 2015. Tesis doctoral:  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_5704\\_Marachlian.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5704_Marachlian.pdf)

- Menzel R, Greggers U (2013) Guidance by odors in honeybee navigation. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 2013 Oct;199(10):867-73.
- Mobbs PG. The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 298: 309–354, 1982.
- Rokni D, Hemmeler V, Kapoor V, Murthy V. An olfactory cocktail party: figure-ground segregation of odorants in rodents. *2014 Nature Neuroscience.* Sep.
- Sachse S, Rappert A, Galizia CG. (1999) The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code. *Eur J Neurosci.* 1999 Nov;11(11):3970-82.
- Sachse & Galizia. The coding of odour-intensity in the honeybee antennal lobe: local computation optimizes odour representation. *2003 European journal of neuroscience*, Vol. 18, pp. 2119-2132.
- Sandoz, J. C., Deisig, N., de Brito Sanchez, M. G., & Giurfa, M. (2007). Understanding the logics of pheromone processing in the honeybee brain: from labeled-lines to across-fiber patterns. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 1, 5.
- Silbering AF, Benton R. (2010) Ionotropic and metabotropic mechanisms in chemoreception: 'chance or design'? *EMBO Rep.* 2010 Mar;11(3):173-9.
- Stopfer M, Jayaraman V, Laurent G. *Neuron*. Intensity versus identity coding in an olfactory system. 2003 Sep 11;39(6):991-1004.
- Stopfer M, Bhagavan S, Smith BH, Laurent G. (1997) Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature.* Nov 6;390(6655):70-4.
- Wilson, R. I. y Mainen, Z. F. (2006). Early events in olfactory processing. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29:163–201.
- Wright, G. A., & Smith, B. H. (2004). Different thresholds for detection and discrimination of odors in the honey bee (*Apis mellifera*). *Chemical Senses*, 29(2), 127-135.